



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CACHARA,
Pseudoplatystoma reticulatum, NA PIRACEMA

Orlando Karim Shiro Junior

CAMPO GRANDE, MS
2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



2013, CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CACHARA,
Pseudoplatystoma reticulatum, NA PIRACEMA, Shiro Jr.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CACHARA,
***Pseudoplatystoma reticulatum*, NA PIRACEMA**

Seminal characteristics of cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, in the spawning

Orlando Karim Shiro Junior

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Lenz Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção
Animal.

CAMPO GRANDE, MS
2013

ORLANDO KARIM SHIRO JUNIOR

**"CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CACHARA *PSEUDOPLATYSTOMA*
RETICULATUM NA PIRACEMA"**

**"SEMINAL CHARACTERISTICS OF CACHARA *PSEUDOPLATYSTOMA*
RETICULATUM IN THE SPAWNING"**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Produção Animal

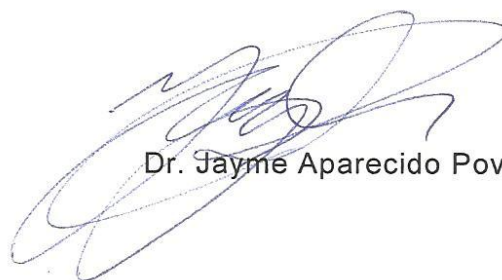
APROVADA: 23/04/2013



Dra. Maria Inês Lenz Souza
Orientadora



Dra. Cristiane Fátima Meldau de Campos Amaral



Dr. Jayme Aparecido Povh



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Dedico

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo

Aos meus pais e irmãos



AGRADECIMENTOS

A Deus e seu filho Jesus Cristo, pela sabedoria e exemplo.

À professora Dra. Maria Inês Lenz Souza, pela orientação e ensinamentos.

À professora Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari, pela coorientação e consideração.

À professora Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva, pelas contribuições e amizade.

Ao professor Dr. Carlos Eurico Fernandes, pelos ensinamentos em estatística e avaliação das amostras.

Ao professor Dr. Celso Benites, pela mentoria e amizade.

À professora Dra. Mônica Cristina Toffoli Kadri, pela contribuição.

Ao Professor Dr. Fernando Almeida Borges, pelo apoio.

À CAPES/REUNI por 13 meses de bolsa de mestrado.

Ao IBAMA pela concessão da autorização para a pesquisa.

Aos pescadores profissionais Renato e Josué do distrito de Camisão, Aquidauana, MS, pelo auxílio na captura dos peixes.

À Letícia da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela atenção e paciência.

Aos técnicos do Laboratório de Biofisiofarmacologia, Márcio, Luis e Walter.

Aos colegas de curso e amigos, Breno Sampaio, Ricardo Pagnoncelli, Heliton Pereira, Marcelo Coutinho, Adriana Zart e Catherine Walker.

Aos companheiros Ricardo Arenales e Luis Eduardo.

Aos meus pais Orlando Karim Shiro e Rosenil Judite da Silva, pelo amor e apoio incondicional.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



*“Então se assentam e juntam os peixes bons em cestos,
mas jogam fora os ruins”.*

(Mateus 13, 48)



Resumo

SHIRO JR., O.K. Características seminais de cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, na piracema. 2013. Dissertação — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Avaliou-se as características seminais de cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, capturados durante a noite, com auxílio de tarrafa, nas corredeiras do Rio Aquidauana, quando realizavam a migração reprodutiva, nos meses de novembro de 2011 a janeiro de 2012. Amostras de sêmen de sete machos com média de $7,55 \pm 3,31$ kg de massa corporal e $85,0 \pm 19,07$ cm de comprimento total, foram colhidas após a captura, sendo identificadas e acondicionadas para o transporte, em caixa isotérmica, mantendo-se uma temperatura aproximada de 4°C para, em seguida, proceder a determinação de volume, coloração, aspecto, odor, pH e integridade espermática, e separação de alíquotas para posterior avaliação de concentração e morfologia espermáticas. O sêmen de cachara apresentou coloração branca e aspecto cremoso, odor *sui generis*, pH 8,0, plasma seminal com $\text{pH } 7,94 \pm 0,30$, concentração de $18,89 \pm 8,63 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} , $93,38 \pm 3,49\%$ de membranas espermáticas íntegras e $16,43 \pm 1,42\%$ dos espermatozoides com anomalias em sua forma, sendo que a mais frequente foi a cauda enrolada na cabeça com $4,76 \pm 0,59\%$. Morfometricamente, as dimensões espermáticas foram, em média, $43,46 \pm 3,90$ μm de comprimento total ($n = 350$ espermatozoides), com cabeça circular sem acrossoma (comprimento: $2,56 \pm 0,18$ μm ; largura: $2,37 \pm 0,16$ μm ; circularidade: $0,95 \pm 0,05$; elipticidade: $1,08 \pm 0,11$), peça intermediária com $0,59 \pm 0,07$ μm e flagelo com $40,30 \pm 3,92$ μm . Os reprodutores desta espécie, em ambiente natural, possuem características seminais, quantitativas e qualitativas, condizentes aos padrões descritos em peixes teleósteos e compatíveis com alta qualidade espermática.

Palavras-chave: surubim; reprodução; fertilidade; sêmen; espermição.



Abstract

SHIRO JR., O.K. Seminal characteristics of cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, in the spawning. 2013. Dissertation — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

We evaluated the characteristics of seminal cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, caught at night with the aid of casting net, in the rapids of the Rio Aquidauana when performed reproductive migration in the months from November 2011 to January 2012. Semen samples from seven males with a mean of 7.55 ± 3.31 kg body weight and 85.0 ± 19.07 cm total length, were harvested after capture, identified and packaged for transport in an isothermal box, maintaining a temperature of about 4°C to then proceed to determine volume, color, appearance, odor, pH, sperm integrity, and distribution of aliquots for further evaluation of sperm concentration and morphology. The semen cachara presented creamy white color, odor *sui generis*, semen pH 8.0 and of seminal plasma 7.94 ± 0.30 , concentration of $18.89 \pm 8.63 \times 10^9$ sperm mL^{-1} , $93.38 \pm 3.49\%$ of sperm membrane integrity and $16.43 \pm 1.42\%$ of sperm with abnormalities in their shape, and the most frequent was the curly tail the head with $4.76 \pm 0.59\%$. Morphometrically dimensions sperm were averaged 43.46 ± 3.90 μm in length ($n = 350$ sperm) having a circular head without acrosome (length: 2.56 ± 0.18 μm width: ± 2.37 0.16 μm ; circularity: 0.95 ± 0.05 ; ellipticity: 1.08 ± 0.11), middle piece with 0.59 ± 0.07 μm and flagellum with $40.30 \pm 3, 92$ μm . The male breeding of this species in the natural environment have semen characteristics, quantitative and qualitative, consistent with the standards described in teleost fish and compatible with high-quality sperm.

Keywords: catfish; reproduction; fertility; semen; spermiation.



Lista de ilustrações

Figura 1. <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	17
Figura 1. Espermatozoide normal de <i>P. reticulatum</i> , sob microscopia de campo claro (aumento de 1000x), submetido à coloração em rosa bengala.....	63
Figura 2. Anormalidades morfológicas espermáticas observadas no sêmen de <i>P. reticulatum</i> , sob microscopia de campo claro (aumento de 1000x), coradas por solução rosa bengala 1%..	64
Figura 3. Percentual de anormalidades morfológicas de <i>P. reticulatum</i> , nas regiões espermáticas.....	65



Lista de quadros

Quadro 1. Comparação da oferta mundial e brasileira de pescado cultivado no ano de 2010.	14
Quadro 2. Médias de pH seminal e do plasma seminal de algumas espécies piscícolas.....	23
Quadro 3. Concentração espermática média (10^9 x espermatozoides mL^{-1}) de algumas espécies piscícolas.	25



Lista de tabelas

Tabela 1. Biometria e volume seminal colhido de cachara, <i>P. reticulatum</i> , na piracema.....	52
Tabela 2. Características seminais de cachara, <i>P. reticulatum</i> , na piracema, expressos em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (DP), valores mínimo e máximo e coeficiente de variação (CV).	52
Tabela 1. Anormalidades morfológicas espermáticas observadas no sêmen de <i>P. reticulatum</i> , em média ($\bar{x}$) $\pm$ erro padrão (EP).	66
Tabela 2. Morfometria espermática de cachara, <i>P. reticulatum</i> , em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC).....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Características do local de amostragem	16
1.2 A espécie <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	16
1.2.1. A reprodução da espécie <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	18
2. AVALIAÇÃO SEMINAL DE PEIXES	20
2.1 Momento da colheita seminal durante a estação reprodutiva	21
2.2 Volume seminal.....	22
2.3 Coloração, aspecto e odor	22
2.4 pH seminal	23
2.5 Concentração espermática	24
2.6 Motilidade espermática	25
2.7 Integridade espermática.....	26
2.8 Morfologia espermática.....	27
2.8.1 Morfometria espermática	28
2.8.2 Anormalidades morfológicas espermáticas	29
3. OBJETIVO	30
REFERÊNCIAS.....	30
Características seminais de cachara na piracema.....	41
Introdução	42
Material e Métodos.....	43
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão	48
Agradecimentos	48
Referências.....	48
Anormalidades morfológicas e morfometria espermáticas de cachara na piracema.....	53
Introdução	54
Material e Métodos.....	55
Resultados e Discussão.....	56
Conclusão	59
Agradecimentos	60
Referências.....	60

1. INTRODUÇÃO

Há uma crescente demanda mundial por alimentos de origem aquática, em todas as faixas de renda da população, não apenas em função da expansão populacional mas, também, pela preferência por alimentos mais saudáveis (QUEIROZ et al., 2002), ao passo que o consumo de pescado está em expansão, pois sua carne é rica em proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), ômega-3 e ômega-6. O efeito dos PUFAs traz benefícios à saúde humana, e faz do peixe um alimento funcional na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002).

No entanto, a pesca extrativista chegou ao seu limite máximo sustentável em 1995, com um total de 100 milhões de toneladas ao ano. Atualmente, encontra-se estagnada e em declínio, pois os estoques naturais de pescado estão cada vez mais escassos (FAO, 2009). Diante deste fato, há uma clara tendência, com espaço e demanda para o aumento da aquicultura, que já vem ocorrendo, sendo esta a melhor alternativa para preservação das espécies e para suprir a demanda por alimentos mais saudáveis (CAMARGO; POUEY, 2005).

A aquicultura e a pesca, desde 2004, alcançaram altas produtividades, abastecendo o mercado mundial com cerca de 140 milhões de toneladas de peixes. Desse total, 110 milhões foram destinados ao consumo humano, em que a aquicultura representou 47% do alimento de peixe, e estima-se a ultrapassagem da pesca extrativista como fonte de peixes. A oferta *per capita* de pescado cultivado passou de 0,7 kg em 1970 para 7,8 kg em 2008, crescendo em uma taxa média anual de 6,6% (FAO, 2010). De 2006 a 2010, há um crescimento de 21,2%, passando para 8,68 kg *per capita* de pescado ofertado pela aquicultura (FAO, 2012a). O Quadro 1 apresenta índices de oferta *per capita* da produção aquícola mundial e no Brasil do ano de 2010, em que observa-se o quanto este índice brasileiro é menor.

No entanto, o Brasil destaca-se como um dos países com maior capacidade para a expansão da aquicultura, pois possui grande potencial hídrico e climático, com 12% da água doce disponível do planeta, um litoral de mais de 8000 km e, ainda, mais de 3,5 milhões de km² de zona econômica exclusiva, possibilitando o cultivo em água salgada e doce (BRASIL, 2011). Sua fauna de peixes de água doce

35 é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies, existindo ainda muitas
36 desconhecidas (BUCKUP et al., 2007).

37 Quadro 1. Comparação da oferta mundial e brasileira de pescado cultivado no ano
38 de 2010.

	Total de pescado ofertado (<i>Milhões de toneladas</i>)	Total da produção aquícola	Populaçã o (<i>Bilhões</i>)	<i>Per</i> <i>capita</i> de pescado total	<i>Per</i> <i>capita</i> de pescado cultivado	Referência
Mundial	128,3	59,9	6,9	18,6	8,68	FAO (2012a)
Brasileira	1,85	0,47	0,19	9,75	2,51	Brasil (2012)

39 Vazzoler (1996), em um estudo de caso com 68 espécies de peixes nativos,
40 constatou que eles pertencem a 22 famílias, sendo as mais representativas em
41 número, as famílias Characidae, Anostomidae e Pimelodidae. Pelo menos 40
42 espécies brasileiras de peixes de água doce são utilizadas em aquicultura, o que
43 representa 1,5% das conhecidas e, pelo menos, quatro híbridos são oferecidos no
44 mercado de alevinos (GODINHO, 2007).

45 Em 2010, a produção aquícola nacional foi de 479.398 toneladas,
46 representando um incremento de 15,3% em relação à produção de 2009.
47 Comparando-se 2010 com o montante produzido em 2008 (365.367 toneladas), fica
48 evidente o crescimento do setor no país, com um incremento de 31,2% na produção
49 durante o triênio 2008-2010. Seguindo o padrão observado nos anos anteriores, a
50 maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental, na qual se
51 destaca a piscicultura continental, que representou 82,3% da produção total nacional
52 (BRASIL, 2012). Na última década, essa atividade cresceu, em média, 23,8% ao ano
53 no Brasil, enquanto a aquicultura mundial cresceu 10,2% (FAO, 2012b).

54 Os principais grupos de organismos aquáticos produzidos no País são os
55 peixes de água doce, que correspondem a cerca de 80 a 85% da produção aquícola
56 nacional, seguido pelos camarões marinhos, com 14%. Atualmente estão sendo
57 cultivadas mais de 64 espécies de organismos aquáticos no Brasil. As mais
58 cultivadas são as tilápias, carpas, redondos e bagres, seguidas pelos camarões de
59 água salgada e moluscos (principalmente mexilhões) (QUEIROZ et al., 2002;
60 CAMARGO; POUEY, 2005).

61 Na Região Centro-Oeste, o cultivo de espécies nativas é a atividade com

maior expressão, como por exemplo as espécies de peixes redondos, como pacu, *Piaractus mesopotamicus*, e tambaqui, *Colossoma macropomum*, além do híbrido destas conhecido como tambacu. Também os bagres pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, e cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, conhecidos também como surubim, sendo mais cultivado o híbrido desses surubins, chamado de ponto e vírgula ou pintado de maneira generalista. Há também outras espécies como a matrinxã, *Brycon cephalus*, a piraputanga, *Brycon microlepis*, o dourado, *Salminus maxillosus*, e o piavuçu, *Leporinus macrocephalus*, porém, os destaques são do pintado e tambacu, em decorrência da maior demanda de consumo (QUEIROZ et al., 2002).

Inúmeras são as vantagens da criação de espécies nativas quando comparadas às exóticas, pois estas encontram-se aclimatadas e são bem aceitas nos mercados consumidores (ZANIBONI FILHO, 2000).

O ritmo de crescimento da aquicultura brasileira é menor do que o indicado pelo seu potencial, devido à falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico, e à difusão da tecnologia de produção e soluções tecnológicas para a produção das espécies nativas de interesse comercial ou ambiental ocorrer de maneira ainda lenta. Enquanto isso, os estoques de peixes nativos vão sendo dizimados dos rios e a piscicultura de peixes nativos continua incapaz de suprir o déficit na oferta de pescado. Assim, o mercado supre esta falta de oferta através da importação de pescado de outros países. E o Brasil, ano após ano, deixa de gerar significativas receitas e empregos em um importante setor de produção de alimentos, a aquicultura (BEERLI et al., 2004; GODINHO, 2007; KUBTIZA et al., 2007).

As características de carne e o desempenho zootécnico atraem cada vez mais o mercado para espécies nativas, entre elas a cachara; porém, os conjuntos tecnológicos para a produção comercial ainda necessitam de ajustes, principalmente no que tange ao aspecto reprodutivo (CREPALDI, 2008). Diante disso, estudos que busquem o melhoramento da eficiência dos processos de produção e a reprodução artificial das espécies nativas, apresentam-se como prioritários para aprimorar o cenário atual, proporcionando subsídios biotecnológicos para o desenvolvimento da aquicultura nacional. Portanto, justifica-se o estudo das características seminais, consideradas muito importantes para a eficiência reprodutiva.

1.1 Características do local de amostragem

As corredeiras do Rio Aquidauana, distrito de Camisão (latitude 20°29'01" Sul; longitude 55°38'29" Oeste), município de Aquidauana, MS, situam-se na área de planalto da Bacia hidrográfica do Alto Paraguai (BRASIL, 2006). Este rio possui corredeiras em seu curso superior e águas barrentas (Resende et al., 1996).

A Região Hidrográfica do Paraguai caracteriza-se como uma das 12 Regiões Hidrográficas brasileiras, está localizada na porção oeste do país, compreendendo uma área de 362.259 km², dos quais 188.374,68 km² correspondem ao Mato Grosso e 173.874,32 km² ao Mato Grosso do Sul, 52% e 48%, respectivamente, na porção brasileira. Compõe-se de duas grandes regiões geológicas distintas, em relação aos recursos naturais e condição hidrológica, o planalto e o pantanal (planície), com áreas respectivas de 214.684,58 km² e 147.574,42 km². Em sua totalidade possui importantes áreas em territórios paraguaio e boliviano, somando-se 496.000 km² (Resende, 2003; BRASIL, 2006).

O Rio Paraguai é o principal rio da bacia ou da região hidrográfica, recebendo água de sub-bacias menores, como a do Rio Miranda, e seu afluente, o Rio Aquidauana. A Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai pode ser dividida por vários trechos. Paraguai Superior e Alto Paraguai são trechos que percorrem o Brasil e suas fronteiras. O Paraguai Superior inicia nas cabeceiras do rio e vai até Cáceres. O Alto Paraguai é o trecho situado entre Cáceres e a foz do Rio Apa. Médio Paraguai e Paraguai Inferior são trechos fora do país. O Médio Paraguai representa o trecho compreendido entre a foz do Rio Apa e Assunção. O Paraguai Inferior, finalmente, compreende o trecho entre Assunção e a confluência com o Rio Paraná (BRASIL, 2013).

Na Região Hidrográfica do Paraguai observa-se a presença dos Biomas Cerrado e Pantanal, além de zonas de transição. As vegetações predominantes são a Savana Arborizada (Cerrado) e a Savana Florestada (Cerradão). O clima predominante é o clima de Savana, com temperaturas médias anuais variando entre 22,5 e 26,5°C. A precipitação média anual é de 1.398mm, variando entre 800 e 1.600mm, sendo os maiores valores observados nas áreas de planalto. O período chuvoso ocorre entre outubro e abril, devido aos ventos de quadrante norte da massa equatorial continental (BRASIL, 2006).

1.2 A espécie *Pseudoplatystoma reticulatum*

A espécie *P. reticulatum* é conhecida como cachara, surubim e surubim-

cachara, e chamava-se *Pseudoplatystoma fasciatum* até a reorganização do gênero *Pseudoplatystoma* (BUITRAGO-SUÁREZ; BURR, 2007), que compreende os maiores peixes da família Pimelodidae, da ordem dos Siluriformes (ROMAGOSA et al., 2003a).

De acordo com Lundberg e Littmann (2003) e Buitrago-Suárez e Burr (2007), a posição taxonômica encontra-se no reino Animalia, filo Chordata, classe Osteichthyes, subclasse Actinopterygii, infraclasse Teleostei, divisão Euteleostei, superordem Ostariophysii, ordem Siluriformes, família Pimelodidae.

Habita exclusivamente a água doce, e pode ser encontrada, com ampla distribuição geográfica, nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, como a Amazônica e do Prata (ROMAGOSA et al., 2003a; BUITRAGO-SUÁREZ; BURR, 2007; FAUSTINO et al., 2007). Pode medir mais de 126 cm, tendo um corpo fusiforme, sem escamas, revestido apenas por pele espessa, ou coberto, parcial ou totalmente, por placas ósseas. A cor do dorso é cinza, ventralmente branca, com características morfológicas peculiares da espécie, bandas claras e escuras transversais perpendiculares ao corpo, espaçadas entre si (Figura 1). Tem três pares de barbilhões, dos quais um no maxilar, preto e, os outros dois, mentonianos brancos. A boca é grande, com dentes viliformes. Os olhos são pequenos, em posição dorsal; as nadadeiras dorsais e peitorais possuem uma espinha dura e serrilhada (ferrão), que produz ictioxina, causando dor quando há ferroadas no manejo e manipulação deste peixe (BRITSKI et al., 1988; PULIDO; BENÍTEZ, 2005).



Figura 1. *Pseudoplatystoma reticulatum* (BUCKUP et al., 2007).

As fêmeas possuem maiores taxas de crescimento em peso corporal que os machos (ROMAGOSA et al., 2003b). Esta espécie possui hábito alimentar exclusivamente piscívoro noturno (RESENDE et al., 1996; PULIDO; BENÍTEZ, 2005). Realiza migrações ao longo dos rios para reproduzir-se durante um determinado período, chamado piracema ou estação reprodutiva, por isso é tida

como reofílica ou migradora (RESENDE et al., 1996; GODINHO, 2007). Por ter este comportamento reprodutivo, está entre as espécies atingidas pela construção de hidroelétricas no Brasil, pela poluição dos rios e pelo assoreamento provocado por desmatamento de matas ciliares. Ainda que não esteja em risco eminente de extinção, esta espécie vem tendo seus estoques naturais reduzidos pela pesca predatória e pelo comércio ilegal de pescados (LOPES et al., 1996; CREPALDI et al., 2006).

É um peixe que têm um alto valor comercial, considerado produto nobre por apresentar carne saborosa, com baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares. Estas características atendem às preferências atuais e futuras do mercado de peixe (KUBITZA et al., 2007).

Em cultivo, participa do cruzamento que resulta na espécie híbrida *Pseudoplatystoma* sp. (*P. corruscans* e *P. reticulatum*) para produção de pintado, consumido e apreciado no mercado nacional e exportado para diversos países europeus, além de Japão e Estados Unidos.

Esta espécie foi escolhida para participar do programa de melhoramento genético de espécies nativas, desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), por suas características desejáveis, visando à substituição do pintado híbrido (RESENDE, 2011). Até então, antes deste programa, o sêmen de cachara não era utilizado visto que, na produção do pintado híbrido cultivado, utiliza-se o macho de pintado com a fêmea de cachara.

A produção de surubins vem crescendo no Brasil, e, principalmente, na região Centro-Oeste. Atualmente, *P. reticulatum* está entre as espécies prioritárias para o crescimento da aquicultura nacional, por apresentar características comerciais e zootécnicas desejáveis, como rápido crescimento e eficiente conversão alimentar (INOUE et al., 2009).

1.2.1. A reprodução da espécie *Pseudoplatystoma reticulatum*

Os primeiros peixes migradores a desovarem são da ordem Characiforme, piraputangas e curimatás, seguidos de dourados e pacus e, os últimos, são os da ordem Siluriformes, pintados e cacharas. Tanto o pintado quanto a cachara tem período reprodutivo curto, de novembro a fevereiro, com picos de reprodução que coincidem com o aumento das chuvas e, consequentemente, a elevação do nível das águas dos rios (RESENDE et al., 1996).

Conforme Godinho (2007), assim como a grande maioria dos teleósteos

(peixes da Classe Actinopterygii), dentre os quais estão os peixes brasileiros de água doce utilizados em aquicultura, a cachara apresenta as seguintes características reprodutivas:

- a) desenvolve ovócitos e espermatozoides em sexos separados;
- b) é ovípara e libera os ovócitos no meio aquático onde são fecundados (fecundação externa);
- c) tem fecundidade elevada, desova total e período de reprodução curto;
- d) os embriões evoluem sem auxílio dos pais, pois contam com o suporte dos nutrientes do vitelo ovocitário para seu desenvolvimento;
- e) a ruptura da casca do ovo libera o embrião, agora denominado larva, cujo desenvolvimento ainda não está completo e o desenvolvimento larval completa-se na pós-larva.

A desova ocorre na cabeceira dos rios, na época das chuvas, ocasião em que estes encontram-se cheios, com águas correntes, turbulentas e oxigenadas, propícias ao desenvolvimento larval, o que possibilita o transporte dos ovos e larvas no sentido do fluxo do rio (RESENDE et al., 1996).

Alguns autores estudaram o epitélio germinativo testicular, a estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides de cachara a partir de fragmentos do testículo (BATLOUNI et al., 2006; QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA, 2008). No entanto, ainda são escassos os estudos sobre as características seminais em surubins. Nesta situação, considera-se essencial o estudo de suas características seminais e de células espermáticas, os quais contribuem para o aperfeiçoamento das técnicas reprodutivas, que contribuirão para reprodução e conservação desta espécie.

Vários trabalhos sobre aspectos reprodutivos da cachara já foram realizados, com amostras de ambiente natural (RESENDE et al., 1996; QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA, 2008) e de cultivo (ROMAGOSA et al., 2003a; BATLOUNI et al., 2006; FANTINI; CAMPOS, 2011; STREIT JR. et al., 2012). No entanto, não se encontrou informações sobre as características seminais desta espécie na piracema.

Estudos com finalidade de obter informações relevantes sobre a reprodução desta espécie devem ser incentivados, pois podem contribuir para o aumento da produção de alevinos (FANTINI; CAMPOS, 2011).

2. AVALIAÇÃO SEMINAL DE PEIXES

Na produção comercial de peixes, é necessário conhecer as características físicas e químicas do sêmen e a estrutura do espermatozoide das espécies cultivadas, assim como avaliar sua qualidade, a fim de aumentar a eficiência da reprodução artificial em sistemas de aquicultura (VERMA et al., 2009).

Na natureza ou sob condições de aquicultura, a qualidade dos gametas de peixes pode ser altamente variável e está sob a influência de um número significativo de fatores externos ou práticas de manejo, por esta razão, recebendo cada vez mais atenção. Alguns dos fatores responsáveis pela variabilidade observada de qualidade dos gametas permanecem desconhecidos ou mal compreendidos, e muito pouco é conhecido sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no controle da qualidade de ovos e espermatozoides (BOBE; LABBÉ, 2010).

Historicamente o interesse no desenvolvimento de ferramentas para avaliar a qualidade do sêmen em peixes foi motivado por vários objetivos, incluindo a necessidade de melhorar os métodos de fecundação artificial, a preservação de gametas masculinos e, mais recentemente, para estudar o impacto da exposição aos poluentes ambientais sobre o sucesso reprodutivo dos peixes. Embora várias técnicas simples e complexas tenham sido usadas, estas nem sempre refletem a capacidade de fecundação dos espermatozoides, que seria a última medida da qualidade do sêmen (RURANGWA et al., 2004).

Sabe-se que nenhum teste isoladamente é capaz de medir a fertilidade de uma amostra de sêmen, necessitando avaliar-se vários aspectos, para predizer a fertilidade potencial de um macho (SILVA et al., 2009).

Estudos realizados sobre a qualidade do sêmen em peixes têm demonstrado alta variação intrínseca ao animal (DREANNO et al., 1998). Segundo Rana (1995), estas variações podem ser devidas à variabilidade genética, ao envelhecimento dos espermatozoides, à sazonalidade, e às técnicas de colheita e avaliação do sêmen. Fatores bióticos e abióticos que afetam a qualidade seminal são diversos e dependem de interações complexas entre fatores genéticos, fisiológicos e ambientais (RURANGWA et al., 2004).

A qualidade do sêmen pode ser avaliada em diferentes níveis, como pela concentração espermática e constituintes do plasma seminal, que permitem uma

visão global da qualidade do sêmen. Por outro lado, viabilidade espermática (integridade de membrana), morfologia e ultraestrutura e características de motilidade espermática estão associadas à capacidade de fecundação individual dos espermatozoides (RURANGWA, et al., 2004).

Para Mies Filho (1987), duas classes de caracteres devem ser levadas em consideração na avaliação espermática, além do exame microbiológico: os caracteres físico/químicos e os microscópicos. Na primeira classe, avaliações para determinar volume, cor, aspecto, odor, pH, osmolaridade e composição química do ejaculado podem ser realizadas. Na segunda, a determinação dos parâmetros relativos à concentração, motilidade, vigor, proporção de espermatozoides vivos e morfologia espermática complementam o estudo necessário à determinação de um material de boa qualidade.

Os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes nativos têm sido baseados, principalmente, em avaliações de motilidade, concentração e integridade espermáticas, sem levar em consideração a ocorrência de defeitos morfológicos nas células espermáticas (KAVAMOTO et al., 1999). No entanto, nos últimos dez anos, alguns trabalhos já ressaltam a importância das alterações morfológicas dos espermatozoides na qualidade do sêmen (VAN LOOK; KIME, 2003; STREIT JR. et al., 2008a; 2008b; 2009; 2012; MARIA et al., 2010; SOARES et al., 2010; SANCHES et al., 2011a).

2.1 Momento da colheita seminal durante a estação reprodutiva

Billard e Cosson (1992) observaram que amostras colhidas no início e ao final da época de reprodução, geralmente não são de boa qualidade. Ao final da época de reprodução, esta condição pode ser ocasionada pelo envelhecimento dos espermatozoides nos testículos. Eles mencionam como desconhecida, a causa da baixa qualidade no início. Entretanto, atualmente, conhece-se que a hidratação seminal e a espermição são reguladas através de hormônios pelo sistema endócrino, que interpreta os estímulos ambientais (MYLONAS et al., 1997; MYLONAS et al., 2010; SCOTT et al., 2010).

Estudos de qualidade seminal de peixes tem contribuído na identificação do melhor momento para colheita de sêmen (ALAVI et al., 2009). O sêmen de peixes não apresenta características constantes durante todo o período de espermição, sendo sua qualidade afetada pelo processo de envelhecimento celular, que se apresenta mais intenso no período posterior ao pico de reprodução (KAVAMOTO et

al., 1999). O fenômeno de envelhecimento espermático, ao final da estação reprodutiva, pode afetar a habilidade de fecundação, através da composição do plasma seminal, concentração espermática, metabolismo energético do ATP espermático, morfologia e morfometria dos espermatozoides, intensidade da motilidade, longevidade e aptidão para o armazenamento e criopreservação, que diminuem rapidamente em um mês (BILLARD, 1986; ALAVI et al., 2008).

Por outro lado, segundo Alavi et al. (2009), há divergências quanto ao melhor momento para a colheita seminal, entre as espécies. As características de qualidade espermática podem comportar-se, durante a estação reprodutiva, tanto de forma crescente como decrescente. Além disso, a comparação é muito difícil em função da reprodução ser regulada pelo sistema endócrino através da interpretação dos estímulos ambientais (WELTZIEN et al., 2004; MYLONAS et al., 2010).

2.2 Volume seminal

O volume de sêmen produzido pelos peixes é muito variável, dependendo do tamanho do indivíduo, época e metodologia de colheita e alimentação, sendo importante para a diluição do material fecundante em reprodução artificial. Os peixes de couro produzem maior volume de sêmen quando comparados aos de escama (GODINHO, 2000; ASTURIANO et al., 2001; ALAVI et al., 2009; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

A produção de reduzido volume de sêmen está entre as disfunções mais comuns (MYLONAS et al., 2010), sendo a produção afetada pela dieta e época da estação reprodutiva (ASTURIANO et al., 2001; ALAVI et al., 2009).

2.3 Coloração, aspecto e odor

A coloração e o aspecto indicam uma maior ou menor quantidade de plasma seminal, que terá influência direta na concentração de espermatozoides e, conseqüentemente, na coloração do sêmen. Por inspeção direta pode-se avaliar a presença de espermatozoides, a mistura de urina, sangue ou pus, fatores limitantes para o aproveitamento do material (MIES FILHO, 1987; ANDRADE-TALMELLI et al., 2001).

Avaliando estas características seminais, Mataveli et al. (2007) associaram, em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, a coloração branca e aspecto cremoso a um sêmen que apresenta maior concentração espermática em relação às colorações branca leitosa e branca aquosa.

Dentre as espécies neotropicais de água doce, há algumas que apresentam

sêmen de cor branca e aspecto leitoso, como a piabanha, *Brycon insignis*, (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001) e o tambaqui (MARIA et al., 2010). Já a matrinxã, *Brycon cephalus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), e a pirapitinga, *Brycon nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), apresentam sêmen leitoso quase transparente, de baixa viscosidade.

Nas distintas espécies, o sêmen tem odor característico (*Sui generis*), mas em espécies como coelho, porco ou ruminantes o odor é quase imperceptível (MIES FILHO, 1987).

2.4 pH seminal

O pH é o símbolo para a identificação numérica simplificada das concentrações hidrogeniônicas das soluções, que indicam a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa (BASTOS et al., 2011). Pode ser determinado usando um medidor de pH (também conhecido como pHmetro) ou, indiretamente, pela adição de um indicador de pH na solução em análise, em que a cor do indicador varia conforme o pH da solução (FELTRE, 2004).

O pH seminal em peixes está entre os fatores que afetam a qualidade espermática, com efeitos na motilidade e no processo de fecundação (FAUVEL et al., 2010), dado que as progestinas 17-20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one (17,20 β -P) ou a 17-20 β -21-P participam de sua regulação (SCOTT et al., 2010). O Quadro 2 exemplifica o pH seminal de algumas espécies de interesse comercial.

Quadro 2. Médias de pH seminal e do plasma seminal de algumas espécies piscícolas.

Espécie	Nome popular	Média do pH $\pm$ DP	Referência
Seminal			
<i>Carassius auratus</i>	gold fish	7,3 $\pm$ 0,48	Bozkurt (2006)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	carpa-capim	7,9 $\pm$ 0,06	Verma et al. (2009)
<i>Colossoma macropomum</i>	tambaqui	8,0 $\pm$ 0,1	Maria et al. (2010)
<i>Merluccius merluccius</i>	merluza	7,6 $\pm$ 0,1	Groison et al. (2010)
<i>Rhinelepis aspera</i>	cascudo-preto	9,39 $\pm$ 0,21	Sanches et al. (2011a)
Plasma seminal			
<i>Gadus morhua</i>	bacalhau	8,32 $\pm$ 0,15	Butts et al. (2011)

Estudos com ciprinídeos e salmonídeos relataram correlações significativas entre pH do plasma seminal e parâmetros de motilidade dos espermatozoides, como velocidade e duração, com seus melhores desempenhos encontrados em pH alcalino (ALAVI; COSSON, 2005).

O pH seminal é um importante parâmetro para a qualidade seminal, destacando-se a necessidade de conhecer o pH ideal para o melhor desempenho dos espermatozoides nas espécies estudadas. Espermatozoides de vendace (*Coregonus albula*) foram móveis em pH 6,5 a 10,5, com a motilidade crescente de 6,5 a 9,0, sendo 9,0 considerado como pH ótimo para a motilidade espermática na espécie (DIETRICH et al., 2010). Além disso, o pH do plasma seminal também é importante para a preparação de diluentes utilizados no armazenamento de sêmen (MARIA et al., 2010).

2.5 Concentração espermática

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa e rotina de avaliação do sêmen de peixes de fecundação externa ou interna, para maximizar o aproveitamento do material fecundante e obter melhores resultados na fecundação (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1987).

A técnica mais simples e com precisão para mensurar a concentração espermática é pela contagem celular na câmara de Neubauer. Chega-se ao resultado final através da contagem do número de células na câmara, de acordo com a proporção de diluição da amostra seminal. Por exemplo, para resultados em mL, com diluição de 1:5000 (Fogli da Silveira et al., 1985; Streit Jr. et al., 2012), sendo a média de células contadas (C) e o fator de diluição (D), realiza-se o seguinte cálculo: concentração espermática (espermatozoides mL⁻¹) = $C \times 10^4 \times D$ = $C \times 10^4 \times 5000$, contando-se o número de espermatozoides nos 25 quadrados, nos dois lados da câmara, para uma mesma amostra. O resultado do número de espermatozoides por mL será o número médio de espermatozoides, contados nos dois lados da câmara, multiplicado por 50 milhões. Logo, para transformar de mL para mm³, basta dividir por 1000; contando-se apenas cinco quadrados, multiplica-se por cinco o resultado.

Em peixes teleósteos, a concentração espermática pode variar de 2×10^6 a $6,5 \times 10^{10}$ espermatozoides mL⁻¹ de sêmen (LEUNG; JAMIESON, 1991). Em espécies brasileiras de água doce a concentração de espermatozoides é altamente

variável, desde $10,9 \times 10^9$ em *Leporinus obtusidens* até $69,9 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} em *Rhamdia quelen* (VIVEIROS; GODINHO, 2009). Contudo, contagens impressionantes, tais como 125×10^9 espermatozoides mL^{-1} em *R. quelen* (BORGES et al., 2005) e 120×10^9 espermatozoides mL^{-1} em *Steindachneridion scripta* (LUZ et al., 2001), têm sido relatadas.

A seguir, no Quadro 3, encontram-se concentrações espermáticas médias de alguns peixes de água doce cultivados no Brasil. A ampla variação neste parâmetro, deve-se aos fatores ambientais, época, manejo, tratamento hormonal e alimentação (RURANGWA et al., 2004; ALAVI et al., 2009; VIVEIROS; GODINHO, 2009; FAUVEL et al., 2010)

Quadro 3. Concentração espermática média ($10^9 \times$ espermatozoides mL^{-1}) de algumas espécies piscícolas.

Espécie	Nome popular	Concentração espermática ($\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$)	Referência
<i>Salminus maxillosus</i>	dourado	$15,92 \pm 2,3$	Streit Jr. et al. (2008a)
<i>Brycon cephalus</i>	matrinxã	$9,6 \pm 1,6$	Ninhaus-Silveira et al. (2006)
<i>Colossoma macropomum</i>	tambaqui	$9,1 \pm 3,7$	Maria et al. (2010)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	carpa capim	$30,0 \pm 0,2$	Verma et al. (2009)
<i>Rhamdia quelen</i>	jundiá	$48,2 \pm 20,2$	Soares et al. (2010)
<i>Prochilodus lineatus</i>	curimba	$23,4 \pm 18,4$	Felizardo et al. (2010)
<i>Rhinelepis aspera</i>	casculo-preto	$21,0 \pm 0,37$	Sanches et al. (2011a)
<i>Oreochromis niloticus</i>	tilápia	$5,2 \pm 0,42$	Sanches et al. (2011b)

2.6 Motilidade espermática

A motilidade dos espermatozoides é o resultado da propagação de ondas ao longo do flagelo, que são geradas por um mecanismo de deslizamento de microtúbulos (GAGNON, 1995).

Nos peixes de fecundação externa, os espermatozoides tornam-se móveis e

metabolicamente ativos após serem lançados na água (RURANGWA et al., 2004), pelo fato da osmolaridade isotônica do plasma seminal suprimir a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce. Quando o sêmen é exposto à hipertonidade da água salgada ou hipotonicidade da água doce, respectivamente, induz à iniciação da motilidade espermática (TAKAI; MORISAWA, 1995).

Deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores, como temperatura da água, estado nutricional, sanidade, condições de avaliação, soluções ativadoras e espécie estudada (MURGAS et al., 2011).

Os espermatozoides apresentam características espécie-específicas como, por exemplo, o início, duração e padrão da motilidade (COSSON et al., 2000). Na maioria das espécies de água doce, as células espermáticas, geralmente, movem-se por menos de dois minutos, mas há muita variação entre as espécies (RURANGWA et al., 2004), como 30-40 segundos a 20°C em carpa, família Cyprinidae (BILLARD et al., 1995a), e 486 segundos a 26°C em pacu (MARIA et al., 2004).

A diminuição da capacidade de movimentos dos espermatozoides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (MURGAS et al., 2011).

2.7 Integridade espermática

A membrana plasmática controla o intercâmbio de íons e água entre meios intra e extracelular. Em um nível subcelular, como parte do espermatozoide, a qualidade espermática pode ser avaliada pela integridade da membrana plasmática do espermatozoide (FAUVEL et al., 2010).

Os espermatozoides de peixes têm sido investigados através de técnicas de coloração supravital, para verificar a integridade, vitalidade ou viabilidade espermáticas, embora a verdadeira viabilidade de espermatozoides seja definida pela sua capacidade de mover-se e fecundar um ovócito (RURANGWA et al., 2004; FAUVEL et al., 2010).

A integridade da membrana espermática é estudada através da avaliação da capacidade de penetração diferencial de corantes, como exemplo, a coloração de vivos e mortos (FLOGLI DA SILVEIRA et al., 1985; KAVAMOTO et al., 1986; MARIA et al., 2010). Nesta técnica utiliza-se uma solução de eosina, que penetra nas membranas danificadas, corando os espermatozoides de rosa, considerados mortos, podendo ser utilizada sozinha ou associada a um corante de contraste, a nigrosina,

que cora as células de membrana íntegra, os espermatozoides vivos.

Recentemente, a integridade das membranas espermáticas tem sido avaliada através da utilização de marcadores de DNA (ácido desoxirribonucleico) fluorescentes por citometria de fluxo, como diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP), que apresentam precisão e rapidez na obtenção dos resultados (FAUVEL et al., 2010). Entretanto, a coloração de eosina-nigrosina continua sendo um método simples, barato e eficaz para avaliação de integridade de membranas espermáticas.

A taxa de espermatozoides vivos (integridade espermática) apresenta estreita relação com a estimativa percentual da motilidade dos espermatozoides, de modo que não há diferença significativa entre os valores de integridade e motilidade espermáticas, como nos casos do bagre *Rhamdia hilarii* 86,73% de viáveis e 81,90% de móveis (KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA, 1986), do curimatã, *Prochilodus scrofa*, 89,13% e 84,40% (KAVAMOTO et al., 1986), 93,69% e 94,63% (KAVAMOTO et al., 1996), do pacu 89,01 e 90,0% (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1990), da piabanha, *Brycon insignis*, 91,21% e 90,90% (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001), e do tambaqui 97,0% e 96,0% (MARIA et al., 2010), respectivamente.

2.8 Morfologia espermática

O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina (KAVAMOTO et al., 1999).

Segundo Jamieson (1991), entre os peixes há distintas estratégias reprodutivas e espermatozoides com diferentes morfologias descritos, o que tem ajudado a esclarecer questões a respeito da filogenia das espécies. A forma, o comprimento e a largura do núcleo espermático apresentam variação e são, frequentemente, associadas ao tipo de fecundação.

Em espécies de fecundação interna, nas quais os espermatozoides são liberados dentro do trato genital feminino, auxiliados por uma papila genital no momento da cópula, os testículos são tubulares, e os espermatozoides apresentam cabeça alongada e peça intermediária mais elaborada e estruturada, classificados como do tipo *introsperm*. Em peixes de fecundação externa, em que os espermatozoides são liberados no ambiente aquático, os testículos são lobulares, e os espermatozoides comumente apresentam cabeça redonda ou oval e peça

intermediária pequena, classificados como do tipo *aquasperm* (BILLARD, 1986; JAMIESON, 1991).

Os espermatozoides de peixes teleósteos não apresentam acrossoma, e a ausência desta estrutura é compensada pela presença de uma micrópila, um orifício presente no córion dos ovos, que geralmente fica aberto entre 10 e 20 segundos, por onde penetram os espermatozoides para começar o processo de fecundação (COSSON, 2004).

Os espermatozoides de peixes de fecundação externa apresentam um flagelo, porém algumas espécies de fecundação interna, como *Ictalurus punctatus* e *Poecilia reticulata*, podem apresentar dois flagelos (BILLARD et al., 1995b). Esta característica está fortemente relacionada com a longevidade (YAO et al., 1999).

A morfologia espermática de algumas espécies de peixes brasileiros tem sido descrita, entre eles a curimba, *Prochilodus lineatus* (KAVAMOTO et al., 1999), o dourado (STREIT JR. et al., 2008a), o jundiá, *R. quelen* (SOARES et al., 2010), o pacu (STREIT JR. et al., 2006), a piapara, *Leporinus elongatus* (STREIT JR. et al., 2008b), o tambaqui (MARIA et al., 2010) e o cascudo-preto, *Rhinelepis aspera* (SANCHES et al., 2011a), bem como, recentemente, alguns aspectos do sêmen de cachara em cultivo (STREIT JR. et al., 2012).

2.8.1 Morfometria espermática

A morfometria espermática faz parte da análise morfológica, na qual se mensuram grandezas geométricas relacionadas às formas do espermatozoide, como por exemplo, comprimento e largura da cabeça, comprimento, largura anterior e posterior da peça intermediária, comprimento do flagelo e comprimento total do espermatozoide (ALAVI et al., 2008; BUTTS et al., 2010; MARIA et al., 2010).

A morfometria da cabeça de espermatozoides anormais tem sido associada com redução da fertilidade em touros (SAILER et al., 1996), cachacos (HIRAI et al., 2001), garanhões (CASEY et al., 1997) e coelhos (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2005), ao passo que foi preditiva para taxas de fertilização *in vitro* em humanos (KRUGER et al., 1995) e utilizada como parâmetro para avaliar os efeitos da criopreservação sobre os espermatozoides em peixes (ASTURIANO et al., 2007).

Gage et al. (2002) estudaram as relações entre a morfometria e a motilidade espermáticas, e não encontraram evidências de que espermatozoides com maiores flagelos sejam capazes de nadar em velocidades acima dos demais. No entanto, espermatozoides com o flagelo encurtado têm velocidades reduzidas (VAN LOOK;

KIME, 2003).

A avaliação da morfometria espermática pode monitorar a variação da qualidade espermática durante a estação reprodutiva (BUTTS et al., 2010) e, identificar o envelhecimento espermático (ALAVI et al., 2008). Do mesmo modo, também fornece informações que podem auxiliar na determinação das melhores condições de criação, como uma ferramenta de avaliação da qualidade da alimentação de reprodutores estocados em ambientes de aquicultura, visto que a composição da dieta alimentar reflete efeitos altamente significativos nos espermatozoides (ALAVI et al., 2009).

Estudos de morfometria espermática em peixes nativos brasileiros são escassos, mas realizou-se, recentemente, um em tambaqui (MARIA et al., 2010).

2.8.2 Anormalidades morfológicas espermáticas

Anormalidades ou deformidades espermáticas estão associadas às deficiências funcionais do espermatozoide, como redução da motilidade e vigor espermáticos, e da habilidade de fecundação (MCALLISTER; KIME, 2003). O aumento das anormalidades espermáticas provoca redução da motilidade e do vigor espermáticos (LAHNSTEINER et al., 1998) e, conseqüentemente, da capacidade de fecundação do espermatozoide. Se o espermatozoide é morfológicamente anormal, a sua capacidade de fecundação e o sucesso da fertilização são, provavelmente, muito baixos ou inexistentes (VAN LOOK; KIME, 2003).

A avaliação de anormalidades morfológicas em espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras, possibilitando prever seu potencial fecundante ou explicar insucessos de reprodutores tidos como aptos após avaliação de motilidade espermática (MURGAS et al., 2011). A determinação de um percentual aceitável de alterações morfológicas é um importante parâmetro de qualidade do sêmen (MARIA et al., 2010).

Em bovídeos, como antílopes e bovinos, foram estudados, especificamente, como cada anormalidade espermática prejudica o processo de fecundação. Vacúolos no colo do espermatozoide podem separar o flagelo e, assim, prejudicar a motilidade (ACKERMAN et al., 1999). O espermatozoide piriforme tem o padrão de motilidade e a estrutura anormais, com capacidade de ligação e penetração na zona pelúcida prejudicada, e o zigoto resultante pode expressar menor competência de clivagem (THUNDATHIL et al., 1999). A gota citoplasmática proximal, outro defeito dos espermatozoides, provoca falhas durante o movimento espermático e na ligação

do espermatozoide com o ovócito, devido à deficiência na motilidade e/ou estrutural e/ou funcional, e seu zigoto não se desenvolve além do estágio de clivagem (THUNDATHIL et al., 2001). A anormalidade chamada *Knobbed defect* prejudica a ligação e penetração do espermatozoide na zona pelúcida (THUNDATHIL et al., 2002). Estes defeitos explicam, em parte, como a infertilidade está associada às anormalidades espermáticas.

Em peixes, a maioria dos estudos relata as alterações morfológicas espermáticas de modo geral, identificando apenas o percentual das mesmas (STREIT JR. et al., 2009; MARIA et al., 2010; SOARES et al., 2010; STREIT JR. et al., 2012). No entanto, sabe-se que espermatozoides com anormalidades na peça intermediária e cauda, mais frequentes, como cauda dobrada e/ou enrolada, ausência de cauda, flagelos encurtados ou quebrados podem ter a sua motilidade diminuída ou ausente, e sua capacidade para fecundar será reduzida ou inexistente (VAN LOOK; KIME, 2003). Quando têm cabeça maior e cauda mais curta, os macrocefálicos, a explicação reside no fato de estarem em transição morfológica, de espermátides para espermatozoides (KAVAMOTO et al., 1999).

3. OBJETIVO

Diante do contexto apresentado, faz-se necessário estudar as características seminais da cachara, com o propósito de obter informações básicas, através do estudo no ambiente natural, para fundamentar e aprimorar o desempenho reprodutivo de machos *P. reticulatum*, em reprodução artificial. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características seminais de cachara na piracema.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, D. J. et al. Sperm abnormalities associated with high copper levels in impala (*Aepyceros melampus*) in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.43, p.261-266. 1999.
- ALAVI, S. M. H. et al. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the

- 569 reproductive season. *Aquatic Living Resources*, v.21, p.75-80. 2008.
- 570 ALAVI, S. M. H. et al. Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets
571 during the spawning season. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.35, p.683-693.
572 2009.
- 573 ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and
574 pH: a review. *Cell Biology International*, v.29, p.101-110. 2005.
- 575 ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N.
576 Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (STEINDACHNER, 1876),
577 após estimulação hormonal. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.27, p.149-154. 2001.
- 578 ASTURIANO, J. F. et al. Effect of sperm cryopreservation on the European Eel
579 sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animals*,
580 v.42, p.162-166. 2007.
- 581 ASTURIANO, J. F. et al. Reproductive performance in male European sea bass
582 (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison
583 with males fed a wet diet. *Aquaculture*, v.194, p.173-190. 2001.
- 584 BASTOS, A. C. L. M.; RODRIGUES, E. M. S.; SOUZA, J. P. I. *Físico-Química*. 1.
585 ed.Bélem: Editora Universitária - UFPA, 2011. 302 p.
- 586 BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male
587 catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of
588 the germinal epithelium An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction*
589 *Science*, v.96, p.116-132. 2006.
- 590 BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R.; FREITAS, R. T. F. Alimentação e comportamento
591 de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Ciência e*
592 *Agrotecnologia*, v.28, p.149-155. 2004.
- 593 BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*,
594 v.129, p.95-112. 1995a.
- 595 BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS,
596 R.J. (Ed.), *Broodstock management and egg and larval quality*. London: Blackwell
597 Science, 1995b. p.25-52.
- 598 BILLARD, R.; COSSON, J. Some problems related to the assessment of sperm
599 motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, v.261, p.122-131. 1992.

- 600 BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species.
601 *Reproduction Nutrition Development*, v.26, p.877-920. 1986.
- 602 BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative*
603 *Endocrinology*, v.165, p.535-548. 2010.
- 604 BORGES, A. et al. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations
605 in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard,
606 Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.31, p.45-53. 2005.
- 607 BOZKURT, Y. Relationship between body condition and spermatological properties
608 in goldfish (*Carassius auratus*) sêmen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*,
609 v.5, p.423-425. 2006.
- 610 BRASIL, 2006. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Recursos
611 Hídricos. *Caderno da Região Hidrográfica do Paraguai*. Brasília: 2006.140 p.
- 612 BRASIL, 2013. MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES. Agência Nacional de
613 Transportes Aquaviários. *Relatório técnico, Bacia do Paraguai, Plano Nacional de*
614 *Integração Hidroviária*. Brasília: 2013. 84 p.
- 615 BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. *Boletim estatístico da pesca e*
616 *aquicultura Brasil 2010*. Brasília, DF, 2012. 129 p. Disponível em: [www.mpa.gov.br/](http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas)
617 [index.php/informacoes-e-estatisticas](http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas). Acesso em: 16 fev. 2013.
- 618 BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. *O potencial brasileiro para a*
619 *aquicultura*. 2011. Disponível em: [www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/](http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro)
620 [informacoes/potencial-brasileiro](http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro). Acesso em: 02 jan. 2013.
- 621 BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. *Manual de identificação de peixes na*
622 *região de Três Marias*. 3.ed. Brasília: Codevasf, 1988. 115 p.
- 623 BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (Ed.). *Catálogo das espécies de*
624 *peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195 p.
- 625 BUITRAGO-SUÁREZ, U. A., BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus
626 *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight
627 species. *Zootaxa*, v.1512, p.1-38. 2007.
- 628 BUTTS, I. A. E. et al. Semen characteristics and their ability to predict sperm
629 cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Theriogenology*, v.75,
630 p.1290-1300. 2011.

- 631 BUTTS, I. A. E.; LITVAK, M. K.; TRIPPEL, E. A. Seasonal variations in seminal
 632 plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus*
 633 *morhua*. *Theriogenology*, v.73, p.873-885. 2010.
- 634 CAMARGO, S. G. O.; POUEY, J. L. O. F. Aquicultura um mercado em expansão.
 635 *Revista Brasileira de Agrociência*, v.11, p.393-396. 2005.
- 636 CASEY, P. J. et al. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and
 637 subfertile stallions. *Theriogenology*, v.47, p.575-582. 1997.
- 638 COSSON, J. et al. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose
 639 sturgeon spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, v.56, p.1348-1367. 2000.
- 640 COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa.
 641 *Aquaculture International*, v.12, p.69-85. 2004
- 642 CREPALDI, D. V. et al. O surubim na aquicultura do Brasil. *Revista Brasileira de*
 643 *Reprodução Animal*, v.30, p.150-158. 2006.
- 644 CREPALDI, D. V. Ultra-sonografia em surubins (*Pseudoplatystoma coruscans*):
 645 avaliação de parâmetros reprodutivos e características de carcaça. 2008. 102f. Tese
 646 (Doutorado em Ciência Animal) — Escola de Veterinária, Universidade Federal de
 647 Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.
- 648 DIETRICH, G. J. et al. Semen biology of vendace (*Coregonus albula* L.). *Fish*
 649 *Physiology and Biochemistry*, v.36, p.419-425. 2010.
- 650 DREANNO, C. et al. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*).
 651 *Aquaculture*, v.169, p.247-262. 1998.
- 652 FANTINI, L. E.; CAMPOS, C. M. Reprodução induzida de cachara *Pseudoplatystoma*
 653 *reticulatum* capturados no pantanal sul, submetidos a diferentes intervalos de tempo
 654 entre as aplicações hormonais. In: *Anais do Encontro de Iniciação Científica - ENIC*,
 655 2011, Aquidauana, MS. *Anais...Aquidauana*: UEMS, 2011.
- 656 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *The state of world*
 657 *fisheries and aquaculture 2010*. Rome: 2010. 197 p.
- 658 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *The state of world*
 659 *fisheries and aquaculture 2012*. Rome: 2012a. 209 p.
- 660 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Fisheries

- 661 Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. *Fishstat Plus: Universal*
 662 *software for fishery statistical time series*. Aquaculture production: quantities 1950-
 663 2005, Aquaculture production: values 1984-2012; Capture production: 1950-2012,
 664 Vers. 2.30. Disponível em: www.fao.org. Acesso em: 02 jan. 2012b.
- 665 FAUSTINO, F. et al. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e
 666 análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (Pintado,
 667 *Pseudoplatystoma corruscans* x Cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Acta*
 668 *Scientiarum. Biological Sciences*, v.29, p.49-55. 2007.
- 669 FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of*
 670 *Applied Ichthyology*, v.26, p.636-643. 2010.
- 671 FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and
 672 morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science*,
 673 v.122, p.259-263. 2010.
- 674 FELTRE, R. *Química: v.2 Físico-Química*. 6.ed. São Paulo: Moderna, 2004. 432 p.
- 675 FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma
 676 de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). *Boletim do*
 677 *Instituto de Pesca*, v.12, p.7-11. 1985.
- 678 FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e
 679 fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887),
 680 proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.17, p.1-13.
 681 1990.
- 682 FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. O método espectrofotométrico na avaliação da
 683 concentração de espermatozóides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. *Boletim*
 684 *do Instituto de Pesca*, v.14, p.69-73. 1987.
- 685 GAGE, M. J. G. et al. Relationships between sperm morphometry and sperm motility
 686 in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, v.61, p.1528-1539. 2002.
- 687 GAGNON, C. Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reproduction,*
 688 *Fertility and Development*, v.7, p.847-855. 1995.
- 689 GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. *Informe Agropecuário*, v.21,
 690 p.16-20. 2000.
- 691 GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases

- 692 para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de*
693 *Reprodução Animal*, v.31, n.3, p.351-360. 2007.
- 694 GROISON, A. L. et al. Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and
695 characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit,
696 osmolality and pH. *Aquaculture*, v.301, p.31-36. 2010.
- 697 HIRAI, M. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry
698 in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal*
699 *of Andrology*, v.22, p.104-110. 2001.
- 700 INOUE, L. A. K. A. et al. *Princípios básicos para produção de alevinos de surubins*
701 *(pintado e cachara)*. 1.ed. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2009. 29 p.
- 702 JAMIESON, B. G. M. (Ed.). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from*
703 *spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 317 p.
- 704 KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do
705 curimbatá, *Prochilodus scrofa* (steindachner, 1881) (osteichthyes, characiformes,
706 prochilodontidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, v.25, p.61-66. 1999.
- 707 KAVAMOTO, E. T. et al. Efeito do hCG na produção de sêmen do curimbatá
708 (*Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881). *Revista Ceres*, v.43, p.76-85, 1996.
- 709 KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e
710 microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em
711 condições de campo. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.13, p.95-100. 1986.
- 712 KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. Características
713 seminais do curimbatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. *Boletim do Instituto*
714 *de Pesca*, v.13, p.45-50. 1986.
- 715 KRUGER, T. F. et al. Sperm morphology: assessing the agreement between the
716 manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyser IVOS. *Fertility*
717 *and Sterility*, v.63, p.134-141. 1995.
- 718 KUBITZA, F.; ONO, E. A.; CAMPOS, J. L. Os caminhos da produção de peixes
719 nativos no Brasil: Uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. *Panorama*
720 *da Aquicultura*, v.102, p.14-23. 2007.
- 721 LAHNSTEINER, F. et al. Determination of semen quality of the rainbow trout,
722 *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and

- 723 spermatozoa metabolism. *Aquaculture*, v.163, p.163-181. 1998.
- 724 LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In:
725 JAMIESON, B. G. M. (ed.). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from*
726 *Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 245-295.
- 727 LOPES, M. C. et al. Alimentação de larvas de surubim pintado, *Pseudoplatystoma*
728 *coruscans* (Agassiz, 1829), em laboratório, na primeira semana de vida. *Boletim*
729 *Técnico do CEPTA*, v.9, p.11-29. 1996.
- 730 LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (long-whiskered
731 catfishes), In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (Ed.). *Check*
732 *list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucr,
733 2003. p.432-446.
- 734 LUZ, R. K. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi,
735 *Steindachneridion scripta* (PIMELODIDAE). *Boletim do Instituto de Pesca*, v.27,
736 p.39-42. 2001.
- 737 MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Detection of sub-fertile rabbits by means of sperm head
738 morphometric analysis. In: *30th Annual Meeting of Journal of Andrology*, 2005,
739 Seattle, WA. Anais... Seattle: American Society of Andrology, 2005. p. 124.
- 740 MARIA, A. N. et al. 2004. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de
741 sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg,
742 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, v.28, p.191-194. 2004.
- 743 MARIA, A. N. et al. Semen characterization and sperm structure of the Amazon
744 tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Applied Ichthyology*, v.26, p.779-
745 783. 2010.
- 746 MATAVELI, M. et al. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo
747 (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes
748 concentrações de vitamina C. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.33, p.1-7. 2007.
- 749 MCALLISTER, B.G.; KIME, D.E. Early life exposure to environmental levels of the
750 aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage
751 in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v.65, p.309-316. 2003.
- 752 MIES FILHO, A. *Inseminação Artificial*. Porto Alegre: Editora Sulina, 6.ed. v.2, 1987.
753 750 p.

- 754 MURGAS, L. D. S. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em
755 peixes nativos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.186-191. 2011.
- 756 MYLONAS, C.C. et al. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and
757 evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery
758 system. *Aquaculture*, v.153, p.301-313. 1997.
- 759 MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal
760 manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, v.165,
761 p.516-534. 2010.
- 762 NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility
763 in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and*
764 *Technology*, v.49, p.651-659. 2006.
- 765 OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de
766 pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*,
767 v.59, p.1509-1515. 2007.
- 768 PULIDO, J. A. R.; BENÍTEZ, H. O. M. Preproducción y manejo de silúridos en
769 cautiverio. In: DAZA, P. V.; PARRA, M. A. L.; OCHOA, A. I. S. *Reproduccion de los*
770 *peces en el tropico*. Bogota: Incoder, 2005. p.105-122.
- 771 QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of
772 spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm
773 ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoologischer Anzeiger*, v.247,
774 p.55-66. 2008.
- 775 QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. *A Embrapa e a*
776 *aquicultura, demandas e prioridades de pesquisa*. Brasília: Embrapa Informação
777 Tecnológica, 2002. 35 p.
- 778 RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.),
779 *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. London: Blackwell Science,
780 1995. p.53-75.
- 781 RESENDE, E. K. *Avanços já alcançados pelo projeto Aquabrazil*. Corumbá:
782 Embrapa Pantanal, 2011. 3 p. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM151>>. Acesso em: 05 nov. 2012.
- 784 RESENDE, E. K. Migratory Fishes of the Paraguay-Paraná Basin, Excluding the

- 785 Upper Paraná Basin. In: CAROLSFIELD, J. et al. (Ed.) *Migratory Fishes of South*
786 *America : Biology, Fisheries and Conservation Status*. Victoria: Alaris Design, 2003.
787 p.99-155.
- 788 RESENDE, E. K. et al. *Biologia do curimatá (Prochilodus lineatus), pintado*
789 *(Pseudoplatystoma corruscans) e cachara (Pseudoplatystoma fasciatum) na bacia*
790 *hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil*. Corumbá:
791 Embrapa-CPAP, 1996. 75 p.
- 792 ROMAGOSA, E. et al. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara,
793 *Pseudoplatystoma fasciatum* (TELEOSTEI, SILURIFORMES, PIMELODIDAE),
794 mantidas em cativeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.29, p.151-159. 2003a.
- 795 ROMAGOSA, E. et al. Características morfométricas e crescimento do cachara,
796 *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), em cativeiro. *Acta Scientiarum.*
797 *Animal Sciences*, v.25, p.277-283. 2003b.
- 798 RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting
799 sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v.234, p.1-28. 2004.
- 800 SAILER, B. L.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Bull sperm head morphometry related
801 to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, v.24, p.167-173. 1996.
- 802 SANCHES, E. A. et al. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis*
803 *aspera*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.357-362. 2011a.
- 804 SANCHES, E. A. et al. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe
805 pelo método de espermátocrito. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.1163-1167.
806 2011b.
- 807 SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P.; STACEY, N. The role of the maturation-inducing
808 steroid, 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish*
809 *Biology*, v.76, p.183-224. 2010.
- 810 SILVA, S. V. et al. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma
811 breve revisão. *Ciência veterinária nos trópicos*, v.12, p.1-15. 2009.
- 812 SOARES, F. A. C. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia*
813 *quelen*) no inverno e na primavera. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.17,
814 p.129-133. 2010.
- 815 STREIT JR., D. P. et al. Parâmetros seminais de reprodutores de *Pseudoplatystoma*

- 816 *reticulatum*, em cativeiro, pré e pós-indução hormonal. *Revista Brasileira de*
817 *Reprodução Animal*, v.36, p.188-193. 2012.
- 818 STREIT JR., D. P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós
819 criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.35,
820 p.159-167. 2009.
- 821 STREIT JR., D. P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus*
822 *maxillosus*) em cativeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.34, p.337-344. 2008a.
- 823 STREIT JR., D. P. et al. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus*
824 *elongatus Valenciennes, 1850*). *Brazilian Journal of Biology*, v.68, p.373-377. 2008b.
- 825 STREIT JR., D. P. et al. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus*
826 *mesopotamicus*) após indução hormonal. *Bioscience Journal*, v.22, p.119-125. 2006.
- 827 SUÁREZ-MAHECHA, H. et al. Importância de ácidos graxos poliinsaturados
828 presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana.
829 *Boletim do Instituto de Pesca*, v.28, p.101-110. 2002.
- 830 TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by
831 external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater
832 teleosts. *Journal of Cell Science*, v.108, p.1175-1181. 1995.
- 833 THUNDATHIL, J. et al. Plasma membrane and acrossomal integrity in bovine
834 spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, v.58, p.87-102.
835 2002.
- 836 THUNDATHIL, J. et al. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the
837 fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Animal*
838 *Reproduction Science*, v.65, p.181-192. 2001.
- 839 THUNDATHIL, J. et al. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-
840 shaped bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.57, p.35-50. 1999.
- 841 VAN LOOK, K. J. W.; KIME, D. E. Automated sperm morphology analysis in fishes:
842 the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*, v.63, p.1020-1033.
843 2003.
- 844 VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos. Teoria e*
845 *prática*. Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.

- 846 VERMA, D. K. et al. Physical and Biochemical Characteristics of Semen and
847 Ultrastructure of Spermatozoa in Six Carp Species. *Turkish Journal of Fisheries and*
848 *Aquatic Sciences*, v.9, p.67-76. 2009.
- 849 VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of
850 Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.35,
851 p.137-150. 2009.
- 852 WELTZIEN, F.A. et al. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special
853 emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*
854 *Part A*, v.137, p.447-477. 2004.
- 855 YAO, Z.; RICHARDSON, G.; CRIM, L. A diluent for prolonged motility of ocean pout
856 (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*, v.174, p.183-193. 1999.
- 857 ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de peixes. *Informe Agropecuário*, v.21, p.69-77.
858 2000.

1 Características seminais de cachara na piracema

2 Orlando Karim Shiro Jr.⁽¹⁾ e Maria Inês Lenz Souza⁽²⁾

3 ⁽¹⁾ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Programa de Pós-Graduação em
4 Ciência Animal, Av. Senador Filinto Müller, nº 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900,
5 Campo Grande, MS. E-mail: okshiro@veterinario.med.br ⁽²⁾ UFMS, Centro de Ciências
6 Biológicas e da Saúde, E-mail: maria.souza@ufms.br

7
8 Resumo — O objetivo deste estudo foi avaliar as características seminais relacionadas à
9 qualidade espermática de reprodutores cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, na piracema.
10 Sete machos ($7,55 \pm 3,31$ kg; $85,0 \pm 19,07$ cm) foram capturados durante a noite, com auxílio
11 de tarrafa, nas corredeiras do Rio Aquidauana (Aquidauana, MS, Brasil), entre novembro de
12 2011 e janeiro de 2012. Nas amostras de sêmen avaliou-se volume, coloração, aspecto, odor,
13 concentração, integridade de membrana e morfologia espermáticas. O sêmen de cachara
14 apresentou, em média, volume de $13,43 \pm 13,22$ mL, coloração branca, aspecto cremoso, odor
15 *sui generis*, com pH seminal 8,0 e do plasma seminal $7,94 \pm 0,30$, concentração média de
16 $18,89 \pm 8,63 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} , e $93,38 \pm 3,49\%$ de membranas espermáticas
17 íntegras e $83,57 \pm 7,56\%$ de espermatozoides normais quanto a morfologia. Os reprodutores
18 desta espécie, em ambiente natural, possuem características seminais, quantitativas e
19 qualitativas, condizentes aos padrões descritos em peixes teleósteos e compatíveis com alta
20 qualidade espermática.

21 Termos para indexação: *Pseudoplatystoma reticulatum*, surubim, sêmen, espermatozoide,
22 espermição, espermatologia.

23
24 Abstract — The objectives of this study were to evaluate the seminal characteristics related to
25 sperm quality breeding cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, in spawning. Seven males
26 (7.55 ± 3.31 kg, 85.0 ± 19.07 cm) were caught at night with the aid of casting net, in the
27 rapids of the Aquidauana river (Aquidauana, MS, Brazil), between the months of November
28 2011 and January 2012. In semen samples were evaluated volume, color, appearance, odor,
29 concentration, membrane integrity and sperm morphology. The semen cachara showed on
30 average volume of 13.43 ± 13.22 mL, white color, creamy appearance, odor *sui generis*, with
31 pH 8.0 and seminal plasma seminal 7.94 ± 0.30 , mean concentration of $18.89 \pm 8.63 \times 10^9$
32 sperm mL^{-1} , and $93.38 \pm 3.49\%$ of intact sperm membranes and $83.57 \pm 7.56\%$ normal sperm
33 morphology. The male breeding of this species in the natural environment have seminal
34 characteristics, quantitative and qualitative, consistent with the standards described in teleost

fish and compatible with high-quality sperm.

Index terms: *Pseudoplatystoma reticulatum*, catfish, semen, spermatozoa, spermiation, spermatology.

Introdução

Pseudoplatystoma reticulatum é um peixe pertencente à família *Pimelodidae*, da ordem dos Siluriformes, cuja espécie é comumente conhecida como cachara e/ou surubim. Habita exclusivamente a água doce e pode ser encontrada, com ampla distribuição geográfica, nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, como a Amazônica e do Prata (Romagosa et al., 2003).

Piracema é o período em que ocorre a atividade migratória dos peixes no sentido ascendente do rio, durante sua estação reprodutiva, na região do Pantanal Sul-Mato-Grossense. A cachara está entre as espécies de piracema, ou seja, realiza migração reprodutiva rumo ao leito dos rios (Resende et al., 1996).

O manejo de reprodutores em aquicultura é um fator chave determinante da qualidade dos gametas e do sucesso da reprodução em cultivo, ao passo que, o conhecimento das características seminais é fundamental na rotina de reprodução artificial, pois permite o uso racional de gametas (Rurangwa et al., 2004), bem como do número de reprodutores (Fogli da Silveira et al., 1985), além de proporcionar informações para determinar o melhor momento para colheita de sêmen, e protocolos de manuseio e conservação espermática.

A qualidade dos espermatozoides é determinada pela sua habilidade em fecundar um ovócito com sucesso. Consequentemente, as características que estiverem correlacionadas, direta ou indiretamente, com a capacidade de fecundação podem ser usadas para determinar a qualidade seminal em peixes (Rurangwa et al., 2004), como o volume e pH seminais, concentração, integridade de membranas e morfologia espermáticas (Fauvel et al., 2010).

As características seminais de algumas espécies de peixes brasileiros têm sido descritas, entre eles a curimba, *Prochilodus lineatus* (Kavamoto et al., 1999), o dourado, *Salminus maxillosus* (Streit Jr. et al., 2008a), a piapara, *Leporinus elongatus* (Streit Jr. et al., 2008b), o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Maria et al., 2010) e o cascudo-preto, *Rhinelepis aspera* (Sanches et al., 2011), bem como, recentemente, alguns aspectos do sêmen de cachara em cultivo (Streit Jr. et al., 2012). Contudo, tratando-se de *P. reticulatum*, ainda existe pouca informação disponível sobre condições ideais para sua reprodução artificial (Viveiros & Godinho, 2009) e pequeno conhecimento a respeito do sêmen de cachara, sendo o estudo de Streit Jr. et al. (2012), o primeiro estudo seminal de cachara em cultivo. Porém,

sabe-se que, em cultivo, o sêmen é frequentemente inadequado em termos de qualidade e quantidade e, nem sempre tem apresentado sucesso na fecundação (Rurangwa et al., 2004). Diante disso, buscou-se essas informações, sem a interferência do manejo de aquicultura, em ambiente natural.

O objetivo deste estudo foi avaliar as características seminais, qualitativas e quantitativas, relacionadas à qualidade espermática de reprodutores *P. reticulatum* na piracema.

Material e Métodos

Entre os meses de novembro de 2011 e janeiro de 2012, realizou-se cinco expedições, com duração média de quatro dias, após a prévia informação de que havia aumento do nível das águas e condições para capturar peixes, com auxílio de tarrafa (redes de arremesso), nas corredeiras do Rio Aquidauana, Aquidauana, MS, Brasil (latitude 20°29'01" Sul; longitude 55°38'29" Oeste). Sete machos de *Pseudoplatystoma reticulatum* com média de $7,55 \pm 3,31$ kg de massa corporal e $85,0 \pm 19,07$ cm de comprimento total, detalhados na Tabela 1, foram capturados durante a noite, sempre no mesmo local, com autorização do Ministério do Meio Ambiente, SISBIO, projeto n.º 31573-1.

Logo após a captura dos reprodutores na corredeira colheram-se amostras de sêmen por massagem na parede celomática ventral, armazenando-as em tubos cônicos identificados e acondicionados em caixa isotérmica (30 x 20 x 15 cm) contendo gelo reciclável, por até 4 horas, mantendo-se uma temperatura aproximada de 4°C, análogo ao método de armazenamento desenvolvido por Marques e Godinho (2004). Em seguida, as amostras foram transportadas até um laboratório de campo para determinação do pH seminal, integridade espermática e acondicionamento de alíquotas para posterior avaliação de concentração e morfologia espermáticas.

O sêmen foi colhido em tubos cônicos graduados em mL, que permitiam a mensuração do volume seminal (Tabelas 1 e 2). Avaliou-se coloração, aspecto e odor do sêmen no momento da colheita, de modo subjetivo. Com o auxílio de tiras indicadoras de pH (MColorpHast, pH 0-14 indicador universal, Merck KGaA, Alemanha) mensurou-se o pH do sêmen resfriado.

As amostras de sêmen foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 g, no mesmo tubo, e o sobrenadante pipetado, para obter-se alíquotas de plasma seminal, nas quais se avaliou o pH com pHmetro digital (pH 21, Hanna Instruments).

Diluiu-se as amostras de sêmen em solução de Ringer lactato formol 0,37% na

proporção 1:5000 (1 μ L:5000 μ L), para determinação da concentração espermática, por contagem em câmara de Neubauer (Fogli da Silveira et al., 1985).

A técnica de coloração vital foi aplicada na avaliação da integridade de membranas espermáticas, a qual utiliza a mistura de sêmen fresco com os corantes eosina e nigrosina, e imediato preparo do esfregaço, completando-se a operação em, no máximo, um minuto. Os espermatozoides com membrana danificada (mortos) coram-se pela eosina, enquanto os de membrana íntegra (vivos) são corados pela nigrosina (Fogli da Silveira et al., 1985).

O percentual de espermatozoides com morfologia normal foi determinado com o uso de amostras seminais, previamente fixadas em solução de Ringer lactato formol 0,37% na proporção 1:1000 (3 μ L:3000 μ L), sendo dois esfregaços de cada corados com solução de rosa bengala a 1% (Maria et al., 2010). Em microscopia de campo claro com aumento de 1000x, contou-se 300 espermatozoides de cada amostra entre os esfregaços corados com eosina-nigrosina ou rosa bengala, totalizando 2100 espermatozoides por avaliação.

Os dados foram avaliados com auxílio de um *software* estatístico e expressos em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Resultados e Discussão

Todas as amostras do sêmen de cachara apresentaram coloração branca, aspecto cremoso, odor *sui generis* e pH seminal 8,0. A Tabela 2 apresenta os valores determinados após avaliação das demais características seminais, em médias e medidas de dispersão.

O presente estudo é o primeiro relato sobre as características seminais de cachara em que se colheram as amostras quando a espécie realizava migração reprodutiva. As características seminais desta espécie, em reprodução natural, foram consideradas compatíveis com sua estratégia reprodutiva ou seu padrão geral de reprodução (Resende et al., 1996). Além disso, podem ser úteis para estudos futuros, tanto de amostras seminais, como das condições de manejo e seleção de reprodutores em aquicultura.

O período de colheitas está dentro do período reprodutivo normal da espécie, que é relativamente curto (de novembro a fevereiro), com picos de reprodução seguindo o regime das chuvas (Resende et al., 1996; Romagosa et al., 2003). Ao mesmo tempo, este mesmo período e as colheitas coincidiram com um período de grande incidência de machos de cachara classificados em maturação final e regressão do testículo, sendo que os machos com testículos em regressão não estão fora de reprodução, mas, sim, em um momento no qual a reprodução ainda está ocorrendo, após a maturação dos espermatozoides (Batlouni et al., 2006). Portanto, o período de amostragem condiz com uma época favorável às características

seminais.

Os reprodutores apresentaram fácil liberação de sêmen, quando massageados ou mesmo sem estímulo, demonstrando encontrarem-se em estado de espermição. Entretanto, o volume obtido não pode ser considerado como o volume total do sêmen liberado pelo macho, uma vez que o método da extrusão não garante a liberação total do sêmen presente (Viveiros & Godinho, 2009), mas é um método comum na rotina de reprodução artificial (Maria et al., 2010).

Encontrou-se uma ampla variação no volume de sêmen colhido dos reprodutores deste estudo (Tabela 1 e 2). Conforme Viveiros & Godinho (2009), o volume seminal em peixes é muito variável. Esta característica pode ser influenciada pela variação individual (Alavi et al., 2007), espécie (Viveiros & Godinho, 2009), tamanho (Luz et al., 2001) e idade do indivíduo (Bastardo et al., 2004), alimentação (Alavi et al., 2009), metodologia e época de colheita (Borges et al., 2005). Neste contexto, de acordo com as diferenças biométricas (comprimento e massa corporal), que refletem a idade do indivíduo (Resende et al., 1996), as diferenças de volumes seminais podem estar apoiadas na variação individual, de tamanho e idade, dos reprodutores estudados.

Comparações de volume seminal são dificultadas pelas variações nos eventos endocrinológicos que regulam a espermição e hidratação do sêmen (Mylonas et al., 1997). Para o valor máximo de volume seminal colhido de um macho, três vezes maior que a média (macho 06, Tabela 2), sugere-se que se deva à possível desova iminente. Leonardo et al. (2004) relatam, em cacharas com peso médio de $1,5 \pm 0,1$ kg, a colheita aproximada de 8 a 9 mL de sêmen por macho, sem indução hormonal. Assim sendo, o volume seminal liberado pelo macho 07 (Tabela 1), pode refletir um indivíduo capturado após a desova.

A concentração espermática, assim como o volume seminal, é uma característica altamente variável em espécies nativas brasileiras (Viveiros & Godinho, 2009). As concentrações espermáticas de $8,0$ a $28,75 \times 10^9$ espermatozoides por mL encontradas neste estudo estão de acordo com a estratégia de fecundidade elevada de cachara, que requer um alto número de espermatozoides (Batlouni et al., 2006). Há uma concentração espermática média semelhante à de cachara (Tabela 2), em uma espécie com iguais estratégias reprodutivas, o cascudo-preto com $21,0 \pm 0,37 \times 10^9$ espermatozoides por mL (Sanches et al., 2011). Além disso, o CV de 45,7% colabora para afirmação de que há variação intra-específica para esta característica em cachara. Por outro lado, verifica-se uma variação interespecífica, quando se compara com jundiá, *Rhamdia quelen*, também da ordem dos

Siluriformes e migrador, com maior concentração espermática, $50,0$ a $66,0 \times 10^9$ espermatozoides por mL, e uma produção individual que chegou a $125,0 \times 10^9$ espermatozoides por mL (Borges et al., 2005). Contudo, um resultado nove vezes menor em relação à concentração espermática de cachara observada na piracema foi relatado em ambiente de cultivo por Streit Jr. et al. (2012), apontando diferenças entre os peixes cultivados e selvagens, também encontradas por Butts et al. (2010) em bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, nesta característica seminal.

Considera-se que o sêmen de coloração branca e aspecto cremoso descrito no presente estudo seja semelhante ou compatível ao sêmen leitoso espesso reportado em cachara (Leonardo et al., 2004). Em avaliação visual, estas duas características podem indicar uma maior ou menor proporção de plasma seminal e, também, a mistura de urina, sangue ou pus, fatores limitantes para o aproveitamento do sêmen (Andrade-Talmelli et al., 2001). Avaliando estas características seminais, Mataveli et al. (2007) associaram, em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, a coloração branca e aspecto cremoso, como a de cachara observada no presente estudo, a um sêmen que apresenta maior concentração de espermatozoides em relação às colorações branca leitosa e branca aquosa. No entanto, no sêmen de cachara, as concentrações espermáticas encontradas foram cerca de sete vezes maiores que em tilápia-do-Nilo. Entre as espécies reofílicas neotropicais de água doce, há algumas que apresentam um sêmen branco leitoso quase transparente, como a matrinxã, *Brycon cephalus*, com $9,61 \pm 1,6 \times 10^9$ espermatozoides por mL (Ninhaus-Silveira et al., 2006) e a pirapitinga, *Brycon nattereri*, um sêmen de baixa viscosidade, mesmo assim, tem concentração espermática maior do que em cachara, com $30,0 \pm 5,6 \times 10^9$ espermatozoides por mL (Oliveira et al., 2007), ou ainda, no caso do jundiá, coloração e aspecto iguais de cachara, com maiores concentrações espermáticas (Borges et al., 2005), evidenciando variações entre coloração, aspecto e concentração espermática interespecíficos.

Nas distintas espécies, o sêmen tem odor característico (*Sui generis*), como referido por Mies Filho (1987). Pelo contrário, em jundiá, o sêmen é descrito como sem odor (Borges et al., 2005). Em cachara, notou-se um cheiro próprio, facilmente perceptível, que se considerou *Sui generis* também.

O pH seminal (do sêmen ou do plasma seminal) desta espécie, em torno de $8,0$, é semelhante ao encontrado para outras espécies como o tambaqui, da ordem dos Characiformes, com pH do sêmen $8,0 \pm 0,10$ (Maria et al., 2010), e, igualmente, para carpa-capim, *Ctenopharyngodon idella*, da ordem dos Cypriniformes, com $7,9 \pm 0,06$ (Verma et al.,

2009) e bacalhau do Atlântico, da ordem dos Gadiformes, com pH do plasma seminal $8,05 \pm 0,19$ (Butts et al., 2010). No entanto, o cascudo-preto, da mesma ordem dos Siluriformes e migrador, têm um pH médio do sêmen mais alcalino, de $9,39 \pm 0,21$ (Sanches et al., 2011). À vista disso, os pequenos DP, determinam baixos CV, que permitem identificar que esta característica seminal comporta-se de modo padrão nas espécies, como em cachara.

A cachara demonstrou alta taxa de espermatozoides vivos e baixo CV (Tabela 2) que, assim como pH seminal, expressa-se como um padrão no sêmen das espécies, comparado aos percentuais médios encontrados em espécies reofílicas, como a piabanha, *Brycon insignis*, com $91,2 \pm 2,6\%$ e CV 2,85% (Andrade-Talmelli et al., 2001), tambaqui com $97,0 \pm 2,0\%$ e CV 2,0% (Maria et al., 2010) e cascudo-preto com $96,5 \pm 4,41\%$ e CV 4,57% (Sanches et al., 2011), sendo os percentuais considerados altos, pois estão acima de 90%, e baixos CV, inferiores a 5%.

Em condições de cultivo de espécies reofílicas, há percentuais de espermatozoides normais, quanto a sua morfologia, semelhantes aos de cachara, como em tambaqui, em que Maria et al. (2010) encontraram cerca de 84%, ou ainda maiores, em curimatá, *Prochilodus scrofa*, em que Kavamoto et al. (1999) verificaram 90% e, em curimba com 97% de normais (Miliorini et al., 2011). Para peixes não há índices morfológicos que possam indicar até que ponto os reprodutores são viáveis (Maria et al., 2010). Miliorini et al. (2011) presumiram que essa percentagem crítica de anormalidades espermáticas para fecundação em curimba, assim como em muitas espécies migradoras brasileiras, seja de 50%, por implicar maior proporção de espermatozoides em relação aos ovócitos, quando comparados com mamíferos. O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) considera uma amostra seminal com taxa inferior a 70% de espermatozoides normais como imprópria para inseminação artificial em outras espécies (CBRA, 1998). Ainda em cultivo, percentuais menores do que deste estudo são encontrados, por exemplo, em Streit Jr. et al. (2008b), que verificaram aproximadamente 64% de normalidade nos espermatozoides de piapara, Streit Jr. et al. (2008a) 57% em dourado, Streit Jr. et al. (2012) 53% em cachara, e Mataveli et al. (2007) 16% em tilápia-do-Nilo. Segundo Miliorini et al. (2011), as variações nesta característica podem ser genéticas ou ambientais. No presente estudo, o valor máximo apresentou 95% de normalidade na morfologia espermática, enquanto o mínimo foi de 72%, mantendo-se dentro das recomendações do CBRA (1998) e da percentagem crítica presumida por Miliorini et al. (2011). Desta forma, infere-se que os percentuais encontrados estão inclusos nos padrões de qualidade espermática.

Estudos que busquem otimizar o uso de reprodutores são importantes para o desenvolvimento da aquicultura, especialmente das espécies nativas brasileiras. Por conseguinte, a determinação dos padrões das características seminais podem auxiliar na conservação dos estoques naturais e produção aquícola, sendo úteis no diagnóstico de falhas reprodutivas e na criopreservação de espermatozoides da espécie. Mais estudos devem ser realizados, a fim de estabelecer as relações de qualidade seminal em *P. reticulatum* com a fertilidade, e estabelecendo outros fatores que possam estar associados às variações das características seminais.

Conclusão

1. O volume seminal e a concentração espermática de cachara são amplamente variáveis.
2. A taxa de integridade espermática é alta e, junto com pH seminal, expressam-se como padrões seminais.
3. O percentual de espermatozoides normais acompanha aos padrões de qualidade espermática de espécies de peixes teleósteos e mamíferos.
4. Os reprodutores *P. reticulatum*, em ambiente natural, possuem características seminais, quantitativas e qualitativas, condizentes aos padrões seminais descritos em peixes teleósteos e compatíveis com alta qualidade espermática.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado.

Referências

- ALAVI, S.M.H.; RODINA, M.; POLICAR, T.; KOZAK, P.; PSENICKA, M.; LINHART, O. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, v.68, p.276-283, 2007.
- ALAVI, S.M.H.; PSENICKA, M.; POLICAR, T.; RODINA, M.; HAMACKOVA, J.; KOZAK, P.; LINHART, O. Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.683-693, 2009.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (STEINDACHNER, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.149-154, 2001.
- BASTARDO, H.; GUEDEZ, C.; LEÓN, M. Características del semen de trucha arcoiris de

- 266 diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. **Zootecnia Tropical**,
 267 v.22, p.277-288, 2004.
- 268 BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. The reproductive cycle of male
 269 catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the
 270 germinal epithelium An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**,
 271 v.96, p.116-132, 2006.
- 272 BORGES, A.; SIQUEIRA, D.R.; JURINITZ, D.F.; ZANINI, R.; AMARAL, F.; GRILLO,
 273 M.L. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen
 274 characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology**
 275 **and Biochemistry**, v.31, p.45-53, 2005.
- 276 BUTTS, I.A.E.; LITVAK, M.K.; TRIPPEL, E.A. Seasonal variations in seminal plasma and
 277 sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*.
 278 **Theriogenology**, v.73, p.873-885, 2010.
- 279 CBRA, 1998. **Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. Colégio**
 280 **Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- 281 FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal Applied**
 282 **Ichthyology**, v.26, p.636-643, 2010.
- 283 FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y. Avaliação da
 284 qualidade e crio-preservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*
 285 (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12, p.7-11, 1985.
- 286 KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.
 287 Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus*
 288 (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto**
 289 **de Pesca**, v.25, p.61-66, 1999.
- 290 LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I.; BATLOUNI, S.R. Induced
 291 spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*
 292 (Linnaeus, 1766). **Aquaculture**, v.240, p.451-461, 2004.
- 293 LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE, D.A.T.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação
 294 qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (PIMELODIDAE).
 295 **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.39-42, 2001.
- 296 MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; SILVA C.A.; CARNEIRO, P.C.F. Semen
 297 characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui (*Colossoma macropomum*).
 298 **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.779-783, 2010.

- 299 MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical
300 characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.799-804,
301 2004.
- 302 MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT-JR., D.P.; VARGAS, L.D.M.; SAKAGUTI,
303 E.S.; TONIATO, J.C.; BARBOSA, R.C.; MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de
304 tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes
305 concentrações de vitamina C. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.33, p.1-7, 2007.
- 306 MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. Porto Alegre: editora Sulina, 6.ed., v.2, 1987.
307 750p.
- 308 MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G.J.M.;
309 COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*)
310 sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v.42, p.177-187, 2011.
- 311 MYLONAS, C.C.; GISSIS, A.; MAGNUS, Y.; ZOHAR Y. Hormonal changes in male white
312 bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release
313 GnRHa delivery system. **Aquaculture**, v.153, p.301-313, 1997.
- 314 NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA; R., SENHORINI, J.A.
315 Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus*
316 (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.651-659, 2006.
- 317 OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; FREITAS, R.T.F.; IZAÚ, Z.A.
318 Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo**
319 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1509-1515, 2007.
- 320 RESENDE, E.K.; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L.; PALMEIRA, S.S.; PEREIRA,
321 R.A.C.; LIMA, M.S.; ALMEIDA, V.L.L. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*),**
322 **pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia**
323 **hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá:
324 Embrapa-CPAP, 1996. 75p.
- 325 ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; GODINHO, H.M. Biologia
326 reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (TELEOSTEI,
327 SILURIFORMES, PIMELODIDAE), mantidas em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**,
328 v.29, p.151-159, 2003.
- 329 RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. The measurement of sperm
330 motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28,
331 2004.

- 332 SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SYKORA, R.M.; XAVIER,
333 A.M.M. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). **Revista Brasileira de**
334 **Reprodução Animal**, v.35, p.357-362, 2011.
- 335 STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; DIGMAYER, M.; GALO, J.M.;
336 MORAES, G.V.; POVH, J.A. Parâmetros seminais de reprodutores de *Pseudoplatystoma*
337 *reticulatum*, em cativeiro, pré e pós-indução hormonal. **Revista Brasileira de Reprodução**
338 **Animal**, v.36, p.188-193, 2012.
- 339 STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; GALO, J.M.;
340 DIGMYER, M. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em
341 cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, p.337-344, 2008a.
- 342 STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; VARGAS, L.D.M.;
343 WATANABE, A.L. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus*
344 Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.373-377, 2008b.
- 345 VERMA, D.K.; ROUTRAY, P.; DASH, C.; DASGUPTA, S.; JENA, J.K. Physical and
346 biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species.
347 **Turkish Journal Fisheries and Aquatic Sciences**, v.9, p.67-76, 2009.
- 348 VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian
349 freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.137-150, 2009.

Tabela 1. Biometria e volume seminal colhido de cachara, *P. reticulatum*, na piracema.

Variáveis	Machos						
	01	02	03	04	05	06	07
Comprimento padrão (cm)	84,0	79,0	86,0	77,6	87,5	97,0	41,0
Comprimento total (cm)	93,0	88,0	91,0	83,0	93,0	103,0	44,0
Largura da cabeça (cm)	16,0	14,0	16,5	14,0	14,5	19,0	9,0
Altura da cabeça (cm)	9,0	10,0	12,0	10,5	11,5	13,0	6,6
Massa corporal (kg)	8,2	6,7	9,1	6,1	8,8	12,3	1,6
Volume seminal colhido (mL)	8,5	11,0	11,0	7,0	13,5	42,0	1,0

Tabela 2. Características seminais de cachara, *P. reticulatum*, na piracema, expressos em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (DP), valores mínimo e máximo e coeficiente de variação (CV).

Características seminais	$\bar{x} \pm DP$	Min.	Máx.	CV (%)
Volume (mL)	13,43 $\pm$ 13,22	1,0	42,0	98,43
Concentração espermática ($\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$)	18,89 $\pm$ 8,63	8,0	28,75	45,70
pH do plasma seminal	7,94 $\pm$ 0,30	7,32	8,22	3,77
Integridade espermática (%)	93,38 $\pm$ 3,49	88,00	97,00	3,73
Morfologia espermática normal (%)	83,57 $\pm$ 7,56	72,00	95,00	9,05

Anormalidades morfológicas e morfometria espermáticas de cachara na piracema

Orlando Karim Shiro Jr.⁽¹⁾ e Maria Inês Lenz Souza⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Av. Senador Filinto Müller, nº 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS. E-mail: okshiro@veterinario.med.br ⁽²⁾ UFMS, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, E-mail: maria.souza@ufms.br

Resumo — Os objetivos deste estudo foram avaliar a morfologia e morfometria dos espermatozoides de cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, na piracema. Sete machos ($7,55 \pm 3,31$ kg; $85,0 \pm 19,07$ cm) foram capturados durante a noite, com auxílio de tarrafa, nas corredeiras do Rio Aquidauana (Aquidauana, MS, Brasil), durante os meses de novembro de 2011 a janeiro de 2012. Avaliou-se a morfologia espermática ($n = 2100$) através de esfregaços corados em solução rosa bengala, classificando-se os espermatozoides em normais ou de acordo com a anormalidade em sua morfologia. As dimensões dos espermatozoides ($n = 350$) foram mensuradas a partir de micrografias digitais. O sêmen de cachara apresentou espermatozoides do tipo aquático, sem acrossoma, sendo que $16,43 \pm 1,42\%$ deles continham anomalias em sua forma, sendo a mais frequente a cauda enrolada na cabeça, representando $4,76 \pm 0,59\%$ das anormalidades. Morfometricamente, as dimensões espermáticas médias foram $43,46 \pm 3,90$ μ m de comprimento total, com uma cabeça circular (comprimento: $2,56 \pm 0,18$ μ m; largura: $2,37 \pm 0,16$ μ m; circularidade: $0,95 \pm 0,05$; elipticidade: $1,08 \pm 0,11$), peça intermediária com $0,59 \pm 0,07$ μ m e flagelo com $40,30 \pm 3,92$ μ m. As anormalidades morfológicas espermáticas mais comuns são de cauda e as diferenças significativas na morfometria dos espermatozoides, entre os indivíduos, é própria da espécie, da mesma forma que a cabeça do espermatozoide é padrão de formato circular.

Palavras-chave: surubim; reprodução; espermição; morfologia espermática; morfometria espermática.

Abstract — This study aimed to evaluate the morphology and morphometry of spermatozoa cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, in spawning. Seven males (7.55 ± 3.31 kg, 85.0 ± 19.07 cm) were caught at night with the aid of casting net, in the rapids of the Rio Aquidauana (Aquidauana, MS, Brazil), between the months of November 2011 and January 2012. We evaluated sperm morphology ($n = 2100$) using smears stained with rose bengal solution, sorting the sperm as normal or abnormal according to their morphology. The dimensions of the spermatozoa ($n = 350$) were measured from digital micrographs. The semen cachara showed sperm aquatic type, without acrosome, and $16.43 \pm 1.42\%$ had abnormalities

in their shape, the most frequent tail wrapped around his head, representing $4.76 \pm 0.59\%$ of abnormalities. Morphometrically dimensions sperm averages were $43.46 \pm 3.90 \mu\text{m}$ in total length, with a circular head (length: $2.56 \pm 0.18 \mu\text{m}$ width: $2.37 \pm 0.16 \mu\text{m}$; circularity: 0.95 ± 0.05 ; ellipticity: 1.08 ± 0.11), middle piece with $0.59 \pm 0.07 \mu\text{m}$ and flagellum with $40.30 \pm 3.92 \mu\text{m}$. The sperm morphological abnormalities are more common tail and significant differences in sperm morphometry among individuals, is own of species, similarly that the head of the sperms is standard circular format.

Keywords: catfish; reproduction; spermiation; sperm morphology; sperm morphometry.

Introdução

O monitoramento da qualidade dos espermatozoides é um passo importante na seleção de reprodutores masculinos, que pode fornecer indícios para problemas seminais. Qualquer parâmetro quantificável que correlaciona-se diretamente com a capacidade de fecundação dos espermatozoides pode, potencialmente, ser usado como uma medida da qualidade espermática (Beirão et al., 2009).

O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente bovinos, pois o percentual de espermatozoides com morfologia normal é correlacionado com a fertilidade (Barth & Oko, 1989). Em peixes, este estudo tem sido relacionado aos diferentes parâmetros sobre a habilidade de fecundação (Rurangwa et al., 2004; Fauvel et al., 2010). Alterações morfológicas nos espermatozoides tem sido descritas em espécies reofílicas neotrópicas de água doce, como curimatá, *Prochilodus scrofa* (Kavamoto et al., 1999), dourado, *Salminus maxillosus* (Streit Jr. et al., 2008a), piapara, *Leporinus elongatus* (Streit Jr. et al., 2008b), tambaqui, *Colossoma macropomum* (Maria et al., 2010) e, recentemente, em cachara (Streit Jr. et al., 2012).

A morfologia espermática varia grandemente, e o mesmo acontece com sua morfometria (Maria et al., 2010). Os espermatozoides de peixes são células sujeitas às variações do testículo para o meio de fecundação. Além disso, podem ser danificados por xenobióticos, elementos tóxicos, alterados por mutação genética, variações sazonais, envelhecimento, estresse oxidativo e parcialmente degradados por protocolos de criopreservação. Sob estas diferentes causas, observam-se alterações na morfologia espermática como irregularidades na cabeça, bem como modificações na morfometria espermática, tais como encurtamento do flagelo e dimensões da cabeça que, conseqüentemente, podem afetar a habilidade de fecundação (Van Look & Kime, 2003;

Asturiano et al., 2007; Alavi et al., 2009; Butts et al., 2010; 2011).

As dimensões dos espermatozoides de espécies reofílicas neotropicais brasileiras de água doce ainda são pouco relatadas, se comparadas à quantidade de estudos sobre morfologia espermática. Maria et al. (2010) descreveram a morfometria espermática do tambaqui, considerando comprimento e largura da cabeça, comprimento da peça intermediária e do flagelo e o comprimento total dos espermatozoides.

Há evidências crescentes de que a poluição ambiental pode afetar a capacidade reprodutiva de animais selvagens (Damstra et al., 2002); neste contexto, as avaliações de morfologia e morfometria espermáticas têm demonstrado eficiência em identificar alterações nos espermatozoides provocadas por metais pesados (por exemplo, mercúrio), como bolhas, quebra parcial (Abascal et al., 2007) e encurtamento do flagelo (Van Look & Kime, 2003).

Os objetivos deste estudo foram avaliar anormalidades morfológicas e morfometria espermáticas de reprodutores *P. reticulatum* na piracema.

Material e Métodos

Entre os meses de novembro de 2011 e janeiro de 2012, realizou-se cinco expedições, com duração média de quatro dias, após a prévia informação de que havia aumento do nível das águas e condições para capturar peixes, com auxílio de tarrafa (redes de arremesso), nas corredeiras do Rio Aquidauana, Aquidauana, MS, Brasil (latitude 20°29'01" Sul; longitude 55°38'29" Oeste). Sete machos de *Pseudoplatystoma reticulatum* com média de 7,55 ± 3,31 kg de massa corporal e 85,0 ± 19,07 cm de comprimento total foram capturados durante a noite, sempre no mesmo local, com autorização do Ministério do Meio Ambiente, SISBIO, projeto n.º 31573-1.

Logo após a captura dos reprodutores na corredeira colheram-se amostras de sêmen, por massagem na parede celomática ventral, armazenando-as em tubos cônicos identificados e acondicionados em caixa isotérmica (30 x 20 x 15 cm) contendo gelo reciclável, por até 4 horas, mantendo-se uma temperatura aproximada de 4°C, análogo ao método de armazenamento desenvolvido por Marques e Godinho (2004). Em seguida, as amostras foram transportadas até um laboratório de campo para acondicionamento de alíquotas para posterior avaliação de morfologia e morfometria espermáticas.

Das amostras previamente fixadas em solução de Ringer lactato e formaldeído 0,37%, diluídas na proporção 1:1000 (3 µL:3000 µL), foram corados dois esfregaços de cada amostra com solução de rosa bengala a 1% (Maria et al., 2010). Observou-se os esfregaços em microscopia de campo claro com objetiva de 1000x, avaliando-se os espermatozoides (n =

2100 espermatozoides, sete machos x 300 espermatozoides) quanto à morfologia, classificando-os em normais ou de acordo com a anormalidade em sua morfologia, adaptadas de Kavamoto et al. (1999), Maria et al. (2010) e Miliorini et al. (2011). As anormalidades foram agrupadas quanto às regiões do espermatozoide, cabeça, peça intermediária e cauda.

Com uma câmera digital Moticam 2300 (Motic[®]) acoplada ao microscópio (Olympus BX 45), em aumento de 1000x, fotografou-se os espermatozoides normais (n = 350; sete machos x 50 espermatozoides) dos esfregaços utilizados na avaliação morfológica. Para fins de análise considerou-se comprimento, largura, área, perímetro, circularidade e elipticidade da cabeça, e comprimento da peça intermediária e do flagelo. O comprimento total do espermatozoide foi calculado pela soma do comprimento da cabeça, peça intermediária e flagelo, estimando-se a circularidade da cabeça espermática pela equação $4\pi \times (\text{área}/(\text{perímetro})^2)$, e a elipticidade pela altura da cabeça/largura da cabeça, de acordo com Tuset et al. (2008) e Butts et al. (2010). Todas as medidas foram realizadas a partir das micrografias digitais, utilizando-se o *software* Motic Image Plus 2.0 (Maria et al., 2010).

Os dados foram avaliados com auxílio de um *software* estatístico e expressos em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP), sendo os resultados apresentados na forma de figura e tabela. Para a comparação das medidas morfométricas entre os machos utilizou-se a análise de variância, com modelo linear multivariável, ajustado (covariância) para o peso do indivíduo, e o teste de Duncan para comparação das médias (P<0,05).

Resultados e Discussão

O presente estudo é o primeiro relato sobre anormalidades morfológicas e morfometria espermáticas de cachara, em que se colheram as amostras quando a espécie realizava migração reprodutiva, em um período condizente com condições favoráveis à qualidade espermática, em termos de maturação gonadal (Batlouni et al., 2006).

O espermatozoide de cachara pode ser classificado como do tipo aquático ou *aquasperm* (Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008), com uma cabeça desprovida de vesícula acrossomal, contendo um núcleo esférico, peça intermediária curta e um flagelo. O núcleo está rodeado por uma fina camada de citoplasma sem organelas, preenchido com cromatina compactada e homogênea, com alta afinidade pelo corante rosa bengala, observado na Figura 1. Esta forma confere com a apresentada em estudos histológicos anteriores nesta espécie, em que utilizou-se microscopia eletrônica para as análises (Batlouni et al., 2006; Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008). Todavia, esta última técnica não pode ser utilizada como rotina nas análises de sêmen, em função do alto custo e baixa praticidade. Neste contexto, o presente

estudo contribui para confirmar a utilização da técnica de coloração e visualização em microscopia óptica de campo claro, para o sêmen de cachara, demonstrando eficácia nas avaliações de morfologia e morfometria espermáticas.

Na Figura 2 visualizam-se as anormalidades espermáticas de *P. Reticulatum* encontradas no presente estudo. Porém, há uma dificuldade para comparação das anormalidades, entre os peixes teleósteos, pois não existe a utilização de um padrão comum de classificação, como a do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para mamíferos domésticos. Miliorini et al. (2011), recentemente, sugeriram uma classificação de anormalidades para curimba, *Prochilodus lineatus*, porém para cachara os estudos ainda são recentes (Streit Jr. et al., 2012).

Caudas encurtadas ou quebradas podem ter a sua motilidade diminuída ou ausente, e a capacidade fecundante muito baixa ou inexistente (Kavamoto et al., 1999; Van Look e Kime, 2003). As anormalidades mais comuns encontradas anteriormente em cachara de cultivo foram de cauda (Streit Jr. et al., 2012), assim como pode-se visualizar na Figura 3 em relação ao presente estudo e, também, em outros peixes migradores como em dourado (Streit Jr. et al., 2008a), piapara, *Leporinus elongatus* (Streit Jr. et al., 2008b) e tambaqui (Maria et al., 2010).

A anormalidade espermática mais frequente em cachara foi cauda enrolada na cabeça com 4,76% (Tabela 1). Em curimba os defeitos mais comuns encontrados foram cauda dobrada e/ou enrolada e ausência da mesma (Kavamoto et al., 1999). O segundo defeito mais comum encontrado no presente estudo foi a cabeça isolada normal, podendo ser denominado ausência de cauda como em curimba, sendo que todos estes não permitem a movimentação espermática. Neste contexto, assim como outras anormalidades morfológicas dos espermatozoides, é importante destacar quais os efeitos determinados pelas anomalias, visto que elas podem interferir no processo de fecundação e/ou no desenvolvimento embrionário (Thundathil et al., 1999; Thundathil et al., 2001).

Entre outras anormalidades espermáticas encontradas em cachara, por exemplo, os espermatozoides com anomalias classificadas como piriformes e gota citoplasmática proximal sofrem alterações no padrão de motilidade, devido à deficiência estrutural e/ou funcional, prejudicando o processo de fecundação, bem como, o zigoto resultante, o qual pode expressar menor competência de clivagem (Thundathil et al., 1999; Thundathil et al., 2001). Os macrocefálicos, cabeça maior e cauda mais curta, são indicativos de transição morfológica, a partir de espermátides para espermatozoides. Os subdesenvolvidos podem ser comparados aos

microcefálicos, descritos anteriormente em cachara de cultivo (Streit Jr. et al., 2012).

As anormalidades de peça intermediária, também encontradas em cachara, podem determinar alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de fecundação (Kavamoto et al., 1999). Murgas et al. (2011) referem-se à importância da avaliação da morfologia de espermatozoides, que pode explicar o insucesso de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática.

Diferenças significativas entre os indivíduos, na morfometria das regiões dos espermatozoides de cachara, verificadas no presente estudo, visualizadas na Tabela 2, são consequência de uma alta variação da morfometria espermática. Estas podem ocorrer devido às variações individuais, dentro de uma mesma espécie e, ainda, no mesmo indivíduo (Noveiri et al., 2006). Gage et al. (1998) citam quem as diferenças na morfometria espermática dentro de um indivíduo podem ser similares ao nível de variação genética da população. Nos espermatozoides de cachara, verificou-se que as diferenças significativas no comprimento total derivam das diferenças do comprimento do flagelo, assim como descrito em espermatozoides de salmão do Atlântico, *Salmo salar* (Gage et al., 1998). Algumas das diferenças relativas à morfometria espermática podem ser explicadas pela alometria co-evolutiva encontrada nas dimensões da cabeça, peça intermediária e flagelo (Gage, 1998). Além disso, diferenças também ocorrem em resposta a fatores como a repetição amostral e métodos de amostragem, condições de captura e nutricionais, época da estação reprodutiva e de outros fatores ambientais que, potencialmente, poderiam influenciar a morfometria (Kopieka et al., 2000; Noveiri et al., 2006; Alavi et al., 2009). Como no presente estudo as amostras seminais foram oriundas de peixes capturados aleatoriamente no rio, sem determinação total das condições ambientais influenciando sobre os animais, não há como determinar exatamente, qual ou quais os fatores foram responsáveis pelas diferenças significativas, exceto o período de amostragem que favorecia a qualidade seminal (Resende et al., 1996; Batlouni et al., 2006).

Além disso, sabe-se que a morfometria espermática altera-se ao longo da estação reprodutiva (Butts et al., 2010). As medidas dos espermatozoides deste estudo referem-se ao período de piracema que, para esta espécie, é de novembro a fevereiro, como picos de reprodução (Resende et al., 1996), sendo que o período de amostragem, novembro a janeiro, refere-se a um período com grande incidência de machos cachara classificados em maturação final e regressão do testículo, de forma que os machos com testículos em regressão não estão

fora de reprodução, mas sim em um momento no qual a reprodução ainda está ocorrendo (Batlouni et al., 2006). Alavi et al. (2009) identificaram o envelhecimento espermático em barbo, *Barbus barbus*, através de diminuição das dimensões da cabeça, peça intermediária, flagelo e, conseqüentemente, do comprimento total. Para cachara este período de envelhecimento, provavelmente, corresponde ao mês de fevereiro. Desta forma, presume-se que os machos deste estudo não se encontravam em período de envelhecimento espermático do final da estação reprodutiva. Portanto, considerou-se as diferenças significativas encontradas na morfometria espermática de *P. reticulatum*, entre os indivíduos, como próprias da espécie.

Com os índices de circularidade e elipticidade da morfometria da cabeça do espermatozoide de cachara caracterizou-se sua forma como circular, com índices de $0,95 \pm 0,02$ de circularidade e $1,08 \pm 0,07$ de elipticidade. Por outro lado, em espermatozoides de bacalhau do Atlântico, *Gadus Morhua*, esses índices são, em média, $0,79 \pm 0,003$ e $1,71 \pm 0,01$ respectivamente, caracterizando uma cabeça elíptica (Butts et al., 2010). Ainda em bacalhau, Tuset et al. (2008) encontraram dois padrões de cabeça para os espermatozoides, circular ($0,98 \pm 0,03$ de circularidade e $1,09 \pm 0,09$ de elipticidade) e elíptico ($0,86 \pm 0,03$ e $1,72 \pm 0,14$, respectivamente), enquanto neste estudo de cachara, confirmou-se apenas o padrão circular da cabeça espermática.

Os resultados encontrados, desta espécie em reprodução natural, podem contribuir em estudos futuros, tanto de amostras seminais, como das condições de manejo e seleção de reprodutores em aquicultura, além de efeitos provocados por poluentes no ambiente aquático. Estudos que busquem otimizar o uso de reprodutores são importantes para o desenvolvimento da aquicultura, especialmente das espécies nativas brasileiras. Por conseguinte, a determinação de anormalidades morfológicas e morfometria espermáticas podem ser úteis no diagnóstico de falhas reprodutivas ou na determinação de fatores deletérios à espermatogênese, assim como na criopreservação de espermatozoides da espécie. Mais estudos devem ser realizados, a fim de estabelecer padrões quantitativos de morfologia e morfometria espermática em *P. reticulatum*, estabelecendo outros fatores associados às variações na morfologia e morfometria dos espermatozoides.

Conclusão

1. As anormalidades morfológicas espermáticas mais comuns em cachara são de cauda.
2. As diferenças significativas na morfometria dos espermatozoides de cachara, entre

os indivíduos, são próprias da espécie.

3. A cabeça do espermatozoide é padrão de formato circular.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado.

Referências

ABASCAL, F.J.; COSSON, J.; FAUVEL, C. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. **Journal of Fish Biology**, v.70, p.509-522, 2007.

ALAVI, S.M.H.; PSENICKA, M.; POLICAR, T.; RODINA, M.; HAMACKOVA, J.; KOZAK, P.; LINHART, O. Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.683-693, 2009.

ASTURIANO, J.F.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PENARANDA, D.S.; GARZON, D.L.; PEREZ, L.; VICENTE, J.S.; JOVER, M. Effect of sperm cryopreservation on the european eel sperm viability and spermatozoa morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.162-166, 2007.

BARTH, A.D., OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University, 1989. 285p.

BATLOUNI, S.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.116-132, 2006.

BEIRÃO, J.; SOARES, F.; HERRÁEZ, M.P.; DINIS, M.T.; CABRITA, E. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. **Theriogenology**, v.72, p.1251-1261, 2009.

BUTTS, I.A.E.; LITVAK, M.K.; TRIPPEL, E.A. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Theriogenology**, v.73, p.873-885, 2010.

BUTTS, I.A.E.; BABIAK, I.; CIERESZKO, A.; LITVAK, M.K.; SŁOWINSKA, M.; SOLER, C.; TRIPPEL, E.A. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Theriogenology**, v.75, p.1290-1300, 2011.

CBRA, 1998. **Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal**. Colégio

- 266 **Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- 267 DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G.
 268 (Eds). **Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors**. Geneva:
 269 World Health Organization, 2002. 180p.
- 270 FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of**
 271 **Applied Ichthyology**, v.26, p.636-643, 2010.
- 272 GAGE, M.J.G. Mammalian sperm morphometry. **Proceedings of The Royal Society B**,
 273 v.265, p.97-103, 1998.
- 274 GAGE, M.J.G.; STOCKLEY, P.; PARKER, G.A. Sperm morphometry in the Atlantic
 275 salmon. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.835-840, 1998.
- 276 KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.
 277 Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus*
 278 (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto**
 279 **de Pesca**, v.25, p.61-66, 1999.
- 280 KOPIEKA, E.F.; WILLIOT, P.; GONCHAROV, B.F. Cryopreservation of Atlantic sturgeon
 281 *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. **Boletim. Instituto**
 282 **Espanol Oceanografía**, v.16, p.167-173, 2000.
- 283 MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; SILVA C.A.; CARNEIRO, P.C.F. Semen
 284 characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui (*Colossoma macropomum*).
 285 **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.779-783, 2010.
- 286 MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical
 287 characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.799-804,
 288 2004.
- 289 MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G.J.M.;
 290 COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*)
 291 sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v.42, p.177-187, 2011.
- 292 MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS, G.C.
 293 Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira**
 294 **de Reprodução Animal**, v.35, p.186-191, 2011.
- 295 NOVEIRI, S.B.; ALIPOUR, A.; POURKAZEMI, M. Sperm morphometry, density and
 296 spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). **Journal of Applied**
 297 **Ichthyology**, v.22, p.380-383, 2006.
- 298 QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of

- spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoologischer Anzeiger**, v.247, p.55-66, 2008.
- RESENDE, E.K.; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L.; PALMEIRA, S.S.; PEREIRA, R.A.C.; LIMA, M.S.; ALMEIDA, V.L.L. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma faciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá: Embrapa-CPAP, 1996. 75p.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28, 2004.
- STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; DIGMAYER, M.; GALO, J.M.; MORAES, G.V.; POVH, J.A. Parâmetros seminais de reprodutores de *Pseudoplatystoma reticulatum*, em cativeiro, pré e pós-indução hormonal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.188-193, 2012.
- STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; GALO, J.M.; DIGMYER, M. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, p.337-344, 2008a.
- STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; VARGAS, L.D.M.; WATANABE, A.L. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.373-377, 2008b.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J.; BARTH, A.D. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.35-50, 1999.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.181-192, 2001.
- TUSET, V.M.; TRIPPEL, E.A.; MONSERRAT, J. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.398-405, 2008.
- VAN LOOK, K.J.W.; KIME, D.E. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.1020-1033, 2003.

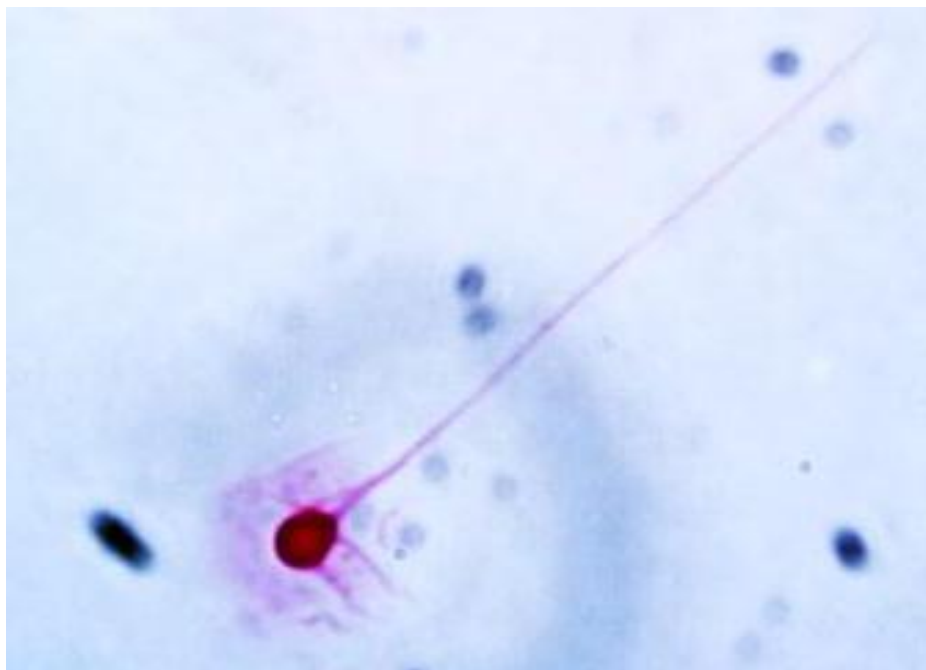


Figura 1. Espermatozoide normal de *P. reticulatum*, sob microscopia de campo claro (aumento de 1000x), submetido à coloração em rosa bengala.

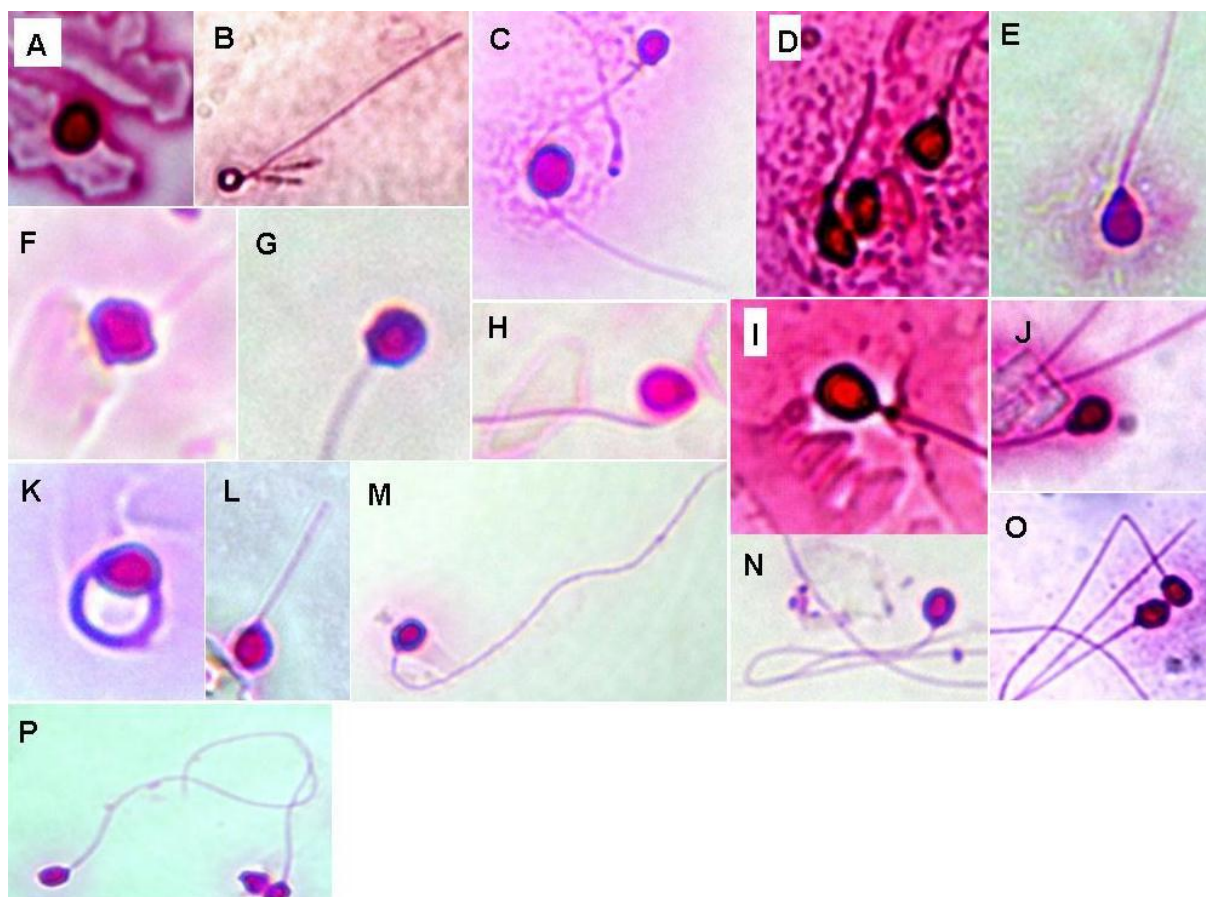


Figura 2. Anormalidades morfológicas espermáticas observadas no sêmen de *P. reticulatum*, sob microscopia de campo claro (aumento de 1000x), coradas por solução rosa bengala 1%. (A) Cabeça isolada normal. (B) Subdesenvolvido. (C) Macrocefalia. (D) Contorno irregular da cabeça. (E) Estreito na base. (F) Cabeça isolada anormal. (G) Piriforme. (H) Retroaxial. (I) Gota citoplasmática proximal. (J) Edema de peça intermediária. (K) Cauda enrolada na cabeça. (L) Cauda quebrada. (M) Caudade dobrada simples. (N) Cauda fortemente enrolada. (O) Cauda fortemente dobrada. (P) Cauda enrolada simples.

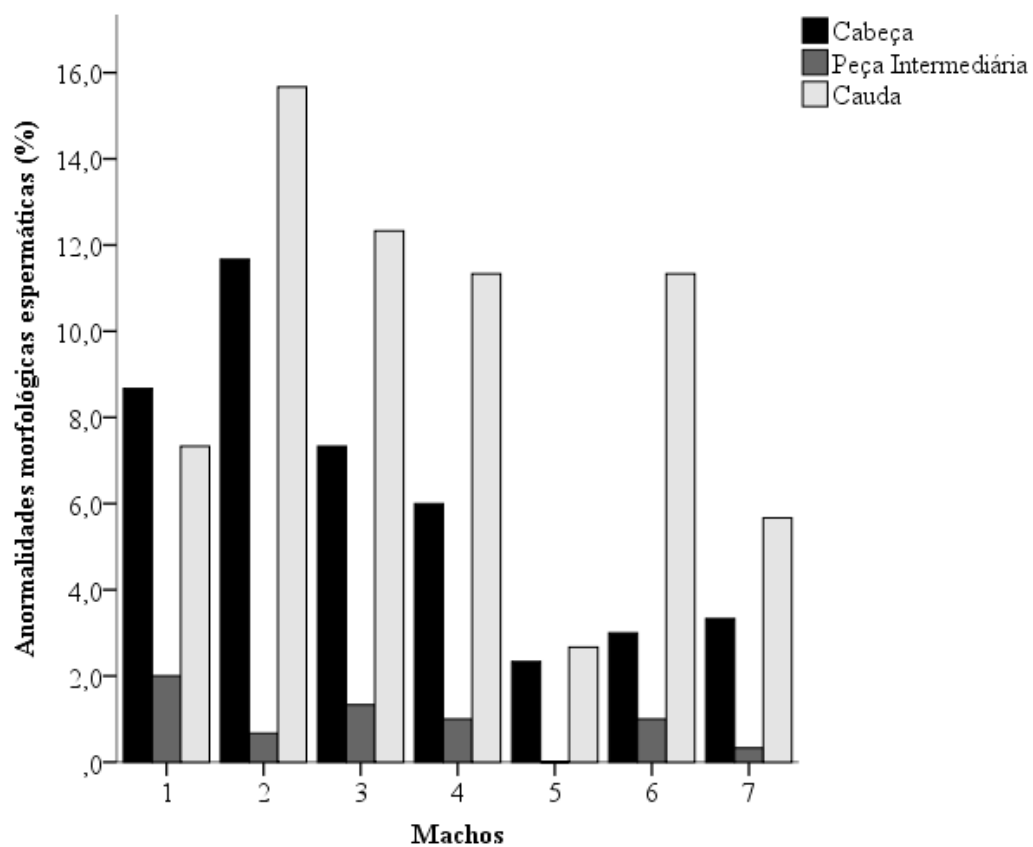


Figura 3. Percentual de anormalidades morfológicas de *P. reticulatum*, nas regiões espermáticas.

Tabela 1. Anormalidades morfológicas espermáticas observadas no sêmen de *P. reticulatum*, em média ($\bar{x}$) $\pm$ erro padrão (EP).

Anormalidades espermáticas (%)	$\bar{x}$	$\pm$ EP
<i>Cabeça</i>	6,05	$\pm$ 1,37
Cabeça isolada normal	3,95	$\pm$ 0,51
Subdesenvolvido	0,71	$\pm$ 0,12
Macrocefalia	0,38	$\pm$ 0,06
Contorno irregular da cabeça	0,33	$\pm$ 0,09
Estreito na base	0,33	$\pm$ 0,07
Cabeça isolada anormal	0,19	$\pm$ 0,04
Piriforme	0,14	$\pm$ 0,03
<i>Peça intermediária</i>	0,90	$\pm$ 0,32
Retroaxial	0,67	$\pm$ 0,11
Gota citoplasmática proximal	0,19	$\pm$ 0,03
Edema de peça intermediária	0,05	$\pm$ 0,02
<i>Cauda</i>	9,48	$\pm$ 1,73
Cauda enrolada na cabeça	4,76	$\pm$ 0,59
Cauda quebrada	2,24	$\pm$ 0,18
Cauda dobrada simples	1,29	$\pm$ 0,27
Cauda fortemente enrolada	0,71	$\pm$ 0,07
Cauda fortemente dobrada	0,24	$\pm$ 0,07
Cauda enrolada simples	0,24	$\pm$ 0,07
<i>Total de anormalidades</i>	16,43	$\pm$ 1,42

Tabela 2. Morfometria espermática de cachara, *P. reticulatum*, em média ($\bar{x}$) $\pm$ desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC).

Variáveis ($\bar{x} \pm DP$)*	Macho 01 (n=50)	Macho 02 (n=50)	Macho 03 (n=50)	Macho 04 (n=50)	Macho 05 (n=50)	Macho 06 (n=50)	Macho 07 (n=50)	$\bar{x} \pm DP$ (n=350)	IC
<i>Cabeça</i>									
Área (μm^2)	4,63 $\pm$ 0,55 ^a	5,24 $\pm$ 0,44 ^c	5,38 $\pm$ 0,55 ^c	5,63 $\pm$ 0,64 ^d	5,71 $\pm$ 0,54 ^d	5,28 $\pm$ 0,44 ^c	4,95 $\pm$ 0,46 ^b	5,26 $\pm$ 0,62	5,20-5,33
Perímetro (μm)	7,82 $\pm$ 0,46 ^a	8,35 $\pm$ 0,40 ^c	8,42 $\pm$ 0,43 ^{cd}	8,60 $\pm$ 0,48 ^{de}	8,70 $\pm$ 0,40 ^e	8,36 $\pm$ 0,34 ^c	8,12 $\pm$ 0,37 ^b	8,34 $\pm$ 0,49	8,29-8,39
Comprimento (μm)	2,40 $\pm$ 0,16 ^a	2,60 $\pm$ 0,14 ^c	2,62 $\pm$ 0,19 ^c	2,67 $\pm$ 0,18 ^c	2,68 $\pm$ 0,14 ^c	2,52 $\pm$ 0,15 ^b	2,47 $\pm$ 0,17 ^{ab}	2,57 $\pm$ 0,19	2,55-2,59
Largura (μm)	2,28 $\pm$ 0,16 ^a	2,37 $\pm$ 0,12 ^{bc}	2,42 $\pm$ 0,17 ^{cd}	2,46 $\pm$ 0,18 ^d	2,46 $\pm$ 0,16 ^d	2,33 $\pm$ 0,12 ^{ab}	2,34 $\pm$ 0,12 ^{ab}	2,38 $\pm$ 0,16	2,36-2,40
Circularidade	0,95 $\pm$ 0,01 ^a	0,94 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,01 ^b	0,95 $\pm$ 0,01 ^b	0,95 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,94 $\pm$ 0,02 ^a	0,95 $\pm$ 0,02	0,94-0,95
Elipticidade	1,06 $\pm$ 0,06 ^a	1,10 $\pm$ 0,06 ^b	1,08 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,09 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,09 $\pm$ 0,08 ^{ab}	1,09 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,06 $\pm$ 0,08 ^a	1,08 $\pm$ 0,07	1,07-1,09
<i>Peça intermediária</i>									
Comprimento (μm)	0,66 $\pm$ 0,08 ^e	0,64 $\pm$ 0,09 ^{de}	0,59 $\pm$ 0,06 ^{bc}	0,61 $\pm$ 0,06 ^{cd}	0,53 $\pm$ 0,07 ^a	0,56 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,60 $\pm$ 0,06 ^c	0,60 $\pm$ 0,07	0,59-0,61
<i>Flagelo</i>									
Comprimento (μm)	41,55 $\pm$ 3,32 ^c	39,98 $\pm$ 3,45 ^{bc}	36,80 $\pm$ 2,90 ^a	38,56 $\pm$ 3,11 ^b	40,27 $\pm$ 3,58 ^c	41,24 $\pm$ 3,84 ^c	43,72 $\pm$ 3,36 ^d	40,30 $\pm$ 3,92	39,87-40,74
<i>Espermatozoide</i>									
Comprimento (μm)	44,61 $\pm$ 3,32 ^c	43,22 $\pm$ 3,45 ^{bc}	40,01 $\pm$ 2,89 ^a	41,84 $\pm$ 3,15 ^b	43,49 $\pm$ 3,60 ^{bc}	44,33 $\pm$ 3,87 ^c	46,79 $\pm$ 3,34 ^d	43,47 $\pm$ 3,90	40,03-40,91

*Valores dentro de uma linha seguidos por letras diferentes expressam diferença significativa pelo teste de Duncan em nível de significância de 5%.