

UNIVERSIDADE FEDERALDE MATO GROSSO DO SUL – UFMS  
*Campus* de CAMPO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCIANIMAL

LOUISE NEX SPICA

Utilização de tecnologia de bioflocos (BFT) no retorno reprodutivo de machos e  
resfriamento de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

CAMPO GRANDE – MS  
MARÇO –2025

LOUISE NEX SPICA

Utilização de tecnologia de bioflocos (BFT) no retorno reprodutivo de machos e resfriamento de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh

**Coorientador:** Prof. Dr. Ruy Alberto Caetano Corrêa Filho

CAMPO GRANDE – MS

MARÇO –2025



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



### Certificado de aprovação

LOUISE NEX SPICA

**UTILIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (BFT) NO RETORNO REPRODUTIVO DE MACHOS E RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**  
**USE OF BIOFLOC TECHNOLOGY (BFT) IN THE REPRODUCTIVE RETURN OF MALES AND SEMEN COOLING OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

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

Aprovado em: 28-02-2025

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Jayme Aparecido Povh  
(UFMS) – Presidente

---

Dr. Danilo Pedro Streit Junior  
(UFRGS)

---

Dr. Diogenes Henrique de Siqueira Silva  
(UNIFESSPA)

---

Dra. Leticia Emiliani Fantini  
(Auburn Universit)

---

Dra. Susana Amaral Teixeira Manso  
(UFMS)

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Jayme Aparecido Povh, Professor do Magisterio Superior**, em 05/03/2025, às 17:32, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Diogenes Henrique de Siqueira Silva, Usuário Externo**, em 06/03/2025, às 04:55, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Pedro Streit Jr, Usuário Externo**, em 06/03/2025, às 08:11, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Emiliani Fantini, Usuário Externo**, em 06/03/2025, às 13:50, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Susana Amaral Teixeira, Professora do Magistério Superior**, em 06/03/2025, às 15:21, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5470987** e o código CRC **9C598337**.

### COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº -

Cidade Universitária Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33  
nº 5470987

SEI

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Marilene Aparecida Nex, que não mediu esforços para que aqui eu chegasse com todo apoio necessário em todas as fases da minha vida, pelo amor incondicional, pela força que me inspira e por ser meu porto seguro.

Aos meus irmãos, Larryssa Nex Spica e Luiz Henryque Nex Spica, Aos meus irmãos, pela força, companheirismo e por serem parte essencial da pessoa que me tornei.

Ao meu filho, Bryan Felipe Spica, minha maior inspiração e motivo para seguir em frente, com a esperança de construir um futuro do qual ele tenha orgulho.

Ao meu namorado, Marcelo de Carvalho Barros, pelo amor, paciência e apoio inabalável em cada etapa desta jornada por toda pós-graduação, tornando meus desafios mais leves.

Aos meus professores, Ruy Alberto Caetano Corrêa Filho e Jayme Aparecido Povh, pela orientação, paciência e por moldarem não apenas meu caminho acadêmico, mas também meu crescimento pessoal, com ensinamentos que levarei para a vida toda.

Aos meus amigos, Lucas de Oliveira Brasileiro, Giovanna Rodrigues Stringhetta e Rebeca Maria Sousa, pela companhia e apoio constante, tanto nos momentos de alegria quanto nos momentos mais desafiadores.

Ao meu grupo de pesquisa, AQUIMS, e a técnica do laboratório da estação de piscicultura, Karina Sanches, pela colaboração, dedicação e pelos momentos de aprendizado compartilhados.

À Piscicultura Piraí e aos meus amigos, Rodrigo Kasai e Yassuo Kasai (Seu Kasai), que, com seu acolhimento e apoio, possibilitaram a realização dos meus projetos, sempre de braços abertos e com confiança.

Ao professor Eduardo Antônio Sanches, pelos valiosos ensinamentos, pela disponibilidade incansável para esclarecer minhas dúvidas e por possibilitar a realização de projetos ao longo da minha carreira acadêmica, contribuindo de forma significativa para o meu crescimento profissional.

Ao professor Danilo Pedro Streit Junior, que me acolheu como "agregada" em seu grupo de pesquisa e me proporcionou a oportunidade de conhecer

lugares e pessoas fundamentais para minha trajetória, além da possibilidade de aprender um pouco sobre a criopreservação de gametas e sua importância, não apenas para o setor produtivo, mas principalmente para a conservação do material genético de espécies ameaçadas de extinção.

Aos amigos grupo AQUAM, Nathalia, Jhonny, Eduardo, Rômulo, Laís, Larise, Thaiza e Karel, pelo acolhimento, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência, orientação e, principalmente, pelos momentos de alegria e diversão que vivemos juntos durante as viagens em busca de dados. Cada experiência reforçou ainda mais o valor dessa parceria.

Ao professor Carlos Eurico Fernandes, e seu grupo de pesquisa, e ao professor Diógenes Henrique de Siqueira Silva, e seu grupo de pesquisa, que colaboraram com a execução das pesquisas em parceria com o AQUIMS, sempre com muito entusiasmo e compartilhando muito conhecimento.

Ao professor Gustavo Coelho Emerenciano, não só por concordar em participar dos projetos em parceria com nosso grupo, como também por nos ensinar tudo que sabemos sobre tecnologia de bioflocos.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ào Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Ào Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul que financiaram os projetos desenvolvidos ao longo da minha pós-graduação.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”* Isaac Newton

## Resumo

SPICA, L.N., Utilização de tecnologia de bioflocos (BFT) no retorno reprodutivo de machos e resfriamento de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2025. 126p. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

A piscicultura brasileira vem apresentando notável crescimento, com destaque para a produção de peixes redondos, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), devido à rusticidade, precocidade e hábito alimentar onívoro, os quais podem impactar na redução dos custos de produção. Apesar da importância comercial, os protocolos reprodutivos para peixes reofílicos, como o pacu, permanecem baseados em métodos antigos, demandando refinamento para melhorar a eficiência. A seleção criteriosa de reprodutores e o manejo adequado da indução hormonal são essenciais para maximizar a produção de alevinos e aprimorar a qualidade reprodutiva. Para determinar as características reprodutivas dos machos, a análise seminal computadorizada assistida (CASA) se destaca por fornecer dados objetivos e detalhados das características cinéticas dos espermatozoides, superando limitações da avaliação subjetiva tradicional. O sistema reprodutivo influencia nas características reprodutivas, tendo em vista que a tecnologia de bioflocos (BFT) mostrou-se mais eficiente que sistema tradicional com renovação de água para a manutenção de reprodutores de pacu por 42 dias, proporcionando maior número de machos responsivos à segunda indução, melhores características seminais, maior índice gonadosomático e recuperação das células reprodutivas mais rápida para o retorno reprodutivo. Além disso, o BFT promoveu maior produção espermática por litro de água consumido, tornando-se uma alternativa ecologicamente sustentável. Por fim, conservar o sêmen de pacu sob refrigeração a 12,63°C por até 8 horas sem diluidores ou crioprotetores, mantém sua viabilidade, o que amplia as possibilidades de uso em reprodução assistida. Esses avanços são fundamentais para otimizar o uso de reprodutores, aumentar a eficiência produtiva e promover a sustentabilidade da piscicultura.

**Palavras-chave:** Análise espermática computadorizada assistida; Aquicultura; Qualidade de sêmen; Reprodução de peixes; Tecnologia de Bioflocos.

### Abstract

SPICA, L.N. Use of biofloc technology (BFT) on reproductive return of males and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) semen cooling. 2025. 126p. Thesis – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Brazilian continental aquacultura has shown remarkable growth, with a focus on the production of round fish species, such as pacu (*Piaractus mesopotamicus*), due to their hardiness in intensive production systems, precocity, and omnivorous feeding habits, which contribute to reducing production costs. Despite their commercial importance, reproductive protocols for rheophilic fish, such as pacu, remain based on outdated methods, requiring refinement to improve efficiency. Careful broodstock selection and proper hormonal induction management are essential to maximize fry production and enhance reproductive quality. Computer-assisted sperm analysis (CASA) stands out by providing objective and detailed data on sperm kinetic characteristics, overcoming the limitations of traditional subjective assessments. The biofloc technology (BFT) system proved more efficient than the traditional partial water renewal system for maintaining pacu breeders for 42 days, resulting in a higher number of males responsive to the second induction, improved sperm characteristics, higher gonadosomatic index, and faster recovery of reproductive cells for reproductive return. Furthermore, BFT promoted greater sperm production per liter of water consumed, making it an environmentally sustainable alternative. Lastly, pacu semen can be stored under refrigeration at 12.63°C for up to 8 hours without diluents or cryoprotectants, maintaining its viability, which expands the possibilities for use in assisted reproduction. These advances are essential to optimize broodstock use, increase production efficiency, and promote sustainable fish farming.

**Keywords:** Aquaculture; Biofloc technology; Computer assisted semen analysis; Fish reproduction; Semen quality.

## Lista de Figuras

CAPÍTULO I – Revisão de Literatura.....	4
Figura 1. Produção de peixes redondos no Brasil nos anos de 2014 a 2023 (IBGE, 2024).....	6
Figura 2. Exemplar de juvenil de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ; Fonte: Autoria própria).....	7
Figura 3. Distribuição geográfica do <i>Piaractus mesopotamicus</i> ao longo das bacias do Prata e Pantanal na América do Sul (Fonte: Autoria própria).....	7
Figura 4. Desenho esquemático dos processos hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas na espermatogênese de machos de peixes (Fonte: Autoria própria).....	9
Figura 5. Microscopia de amostra de água de sistema de tecnologia de bioflocos com presença de flocos, fitoplâncton e zooplâncton (Fonte: Autoria própria).....	17
CAPÍTULO II – Caracterização da qualidade seminal de peixes: movimento espermático, parâmetros físico-químicos e avaliação computadorizada (CASA).....	39
Figura 1. Esquema ilustrativo evidenciando as três regiões principais da morfologia de um espermatozoide de <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Fonte: Autoria própria).....	43
Figura 2. Observação de espermatozoides em microscopia utilizando uma câmera hematimétrica de Neubauer. A: Deposição de amostra de sêmen em um dos campos (campo inferior); B: Câmara hematimétrica de Neubauer e lamínula de vidro; C: Observação de células espermáticas sobre os quadrantes marcados pelas linhas perpendiculares (Fonte: Autoria própria).....	47
Figura 3. Espermatozoides em lâmina montada para avaliação de taxa de integridade de membrana. A: célula branca, indicando membrana íntegra; B: célula rosada, indicando membrana danificada (corante: eosina-nigrosina; aumento final: 400x; Fonte: Autoria própria).....	48
Figura 4. Espermatozoides em lâmina montada para avaliação de taxa de normalidade. A: espermatozoide com gota na região proximal da cauda; B: espermatozoide com cauda curta; C: cabeça solta (corante: rosa de bengala; aumento final: 400x; Fonte: Autoria própria).....	49

- Figura 5. Captura de tela ilustrando as imagens devidamente tratadas importadas no *software* ImageJ juntamente com os 18 parâmetros adequados para avaliação do sêmen inseridos no aplicativo CASA (Fonte: Autoria própria)..... 51
- Figura 6. Imagem gerada pelo software CASA-SCA® evidenciando a trajetória dos espermatozoides classificados como rápidos (vermelho), com velocidade média (verde), lentos (azul) e imóveis (amarelo; Fonte: Autoria própria)..... 52
- Figura 7. Imagem ilustrativa das trajetórias isoladas de cinco espermatozoides de *P. mesopotamicus* e sua classificação de acordo com seus respectivos valores para VCL, VAP e VSL (Fonte: Autoria própria)..... 53
- Figura 8. Transcrição da trajetória de uma célula espermática de *Piaractus mesopotamicus* e *Astyanax lacustris* em plano cartesiano (*xy*) evidenciando as diferentes trajetórias e os pontos levados em consideração para o cálculo de VCL, VAP e VSL em cada caso (Fonte: Autoria própria)..... 55
- Figura 9. Esquema ilustrativo da trajetória de um espermatozoide e os diferentes deslocamentos levados em consideração para os cálculos das suas diferentes velocidades (taxa de captura = 100 *fps*; Fonte: Autoria própria)..... 55
- Figura 10. Esquema ilustrativo da trajetória de espermatozoides com valores semelhantes de VAP e diferentes valores de VCL. Valor da trajetória total de A= 54,7  $\mu\text{m}$ ; Valor da trajetória total de B= 65,7  $\mu\text{m}$  (taxa de captura = 100 *fps*; Fonte: Autoria própria)..... 56
- Figura 11. Esquema ilustrativo evidenciando a diferença entre valores de BCF e ALH entre espécies com diferentes padrões de movimentação (Fonte: Autoria própria)..... 57
- Figura 12. Imagem ilustrativa da variação do trajeto de um espermatozoide de acordo com a taxa de frames utilizada para captura do vídeo. Trajetória em vermelho (25 *fps*): PROG = 37,9 unidades; amarelo: PROG = 43,7 unidades; verde: PROG = 45,9 unidades; azul: PROG = 48,6 unidades (trajetória mais próxima da real; Fonte: Autoria própria)..... 58

CAPÍTULO III – Coletas sucessivas de sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> em tecnologia de bioflocos durante o período reprodutivo.....	64
Figura 1. Distribuição das unidades experimentais nos dois diferentes tratamentos (sistema com troca parcial de água – PWR e sistema de bioflocos – BFT). Em cinza escuro estão representados os animais que espermiaram com sucesso e em cinza claro aqueles que não espermiaram ou não produziram quantidade suficiente de sêmen para análises (<10µL).....	70
Figura 2. Índices de qualidade de água ao longo das quatro quinzenas do período experimental para os dois sistemas de produção (PWR e BFT). NAT - nitrogênio amoniacal total (mg/L); NO <sub>2</sub> - nitrito (mg/L), NO <sub>3</sub> - nitrato (mg/L) e ALK - alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /mL).....	72
Figura 3. Número e percentagem de pacus que espermiaram após reprodução induzida em dois momentos: anteriormente aos reprodutores serem alocados nas unidades experimentais, e após 42 dias de manutenção dos sistemas com renovação de água (PWR) ou sistema tecnologia de bioflocos (BFT).....	78
Figura 4. Índice gonadossomático (após coleta do sêmen) de testículos de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) após uma segunda reprodução induzida e manutenção por 42 dias em tecnologia de bioflocos (BFT) e em sistema com troca parcial de água (PWR).....	82
Figura 5. Imagem ilustrativa evidenciando a diferença de comprimento de testículos de Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) após uma segunda reprodução induzida e manutenção por 42 dias em tecnologia de bioflocos (BFT; direita) e em sistema com troca parcial de água (PWR, esquerda).....	83
Figura 6. Morfologia dos testículos (após coleta do sêmen) de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) após uma segunda reprodução induzida e manutenção por 42 dias em sistema com troca parcial de água (PWR; a-b) e em tecnologia de bioflocos (BFT; c-d).....	84
CAPÍTULO IV – Tempo de viabilidade do sêmen de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) armazenado sob resfriamento.....	103
Figura 1. Desenho experimental para a distribuição do sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos tratamentos em temperatura ambiente (25,23 ± 0,72 °C) e sob refrigeração em caixa térmica (12,63 ± 2,55 °C).....	108
Figura 2. Resultados obtidos ao longo do tempo para os parâmetros avaliados pelo CASA para sêmen de pacu armazenado em temperatura ambiente e resfriado.....	112

Figura 3. Trajetória dos espermatozoides 10 segundos após a ativação.....	115
Figura 4. Resultados obtidos ao longo do tempo para: A) taxa de normalidade dos espermatozoides (%) e; B) taxa de integridade da membrana (%); para sêmen de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) armazenado em temperatura ambiente e sob resfriamento.....	116
Figura 5. Lâmina de morfologia representando algumas das anormalidades mais comuns encontradas nas amostras.....	120

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I – Revisão de Literatura</b> .....	4
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
1.1. <i>O pacu (P. mesopotamicus) na piscicultura do Brasil</i> .....	5
1.2. <i>Reprodução de machos reofílicos</i> .....	8
1.2.1. <i>Seleção de reprodutores</i> .....	10
1.2.2. <i>Manejo de indução hormonal</i> .....	10
1.3. <i>Análise seminal em peixes</i> .....	12
1.4. <i>Retorno reprodutivo</i> .....	14
1.5. <i>Tecnologia de bioflocos na reprodução de peixes</i> .....	16
1.6. <i>Conservação de células espermáticas</i> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1. <i>Objetivo geral</i> .....	22
2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO II – Caracterização da qualidade seminal de peixes: movimento espermático, parâmetros físico-químicos e avaliação computadorizada (CASA)</b> .....	39
<b>1. Introdução</b> .....	42
<b>2. Morfologia e movimento espermático</b> .....	43
<b>3. Características quantitativas e qualitativas do sêmen</b> .....	44
<b>4. Computer assisted semen analysis – CASA</b> .....	50
4.1. <i>Descrição de variáveis cinéticas</i> .....	53
4.2. <i>Taxa de frames por segundo (fps)</i> .....	58
<b>5. Conclusão</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
<b>CAPÍTULO III – Coletas sucessivas de sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> em tecnologia de bioflocos durante o período reprodutivo</b> .....	64
<b>1. Introdução</b> .....	67
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	69
2.1. <i>Alocação</i> .....	69
2.2. <i>Desenho experimental</i> .....	69
2.3. <i>Qualidade de água dos sistemas BFT e PWR</i> .....	71
2.4. <i>Indução hormonal</i> .....	72
2.5. <i>Características reprodutivas</i> .....	73

2.5.1. Concentração espermática .....	74
2.5.2. Análise espermática computadorizada assistida (CASA) .....	74
2.5.3. Citometria de fluxo .....	75
2.6. Morfologia, histologia e análise estereológica de gônadas .....	76
<b>3. Resultados</b> .....	<b>77</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>85</b>
4.1. Segunda reprodução induzida após manutenção dos reprodutores em BFT e PWR .....	85
4.2. Características Quantitativas do Sêmen .....	86
4.3. Características cinéticas do Sêmen .....	88
4.4. Integridade da Membrana e Atividade Mitocondrial .....	89
4.5. Análise morfológica, histológica e estereológica do tecido testicular .....	90
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>91</b>
<b>Referências</b> .....	<b>92</b>
CAPÍTULO IV - Tempo de viabilidade do sêmen de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) armazenado sob resfriamento .....	
	103
<b>1. Introdução</b> .....	<b>106</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>107</b>
2.1. Local, peixes e manejo reprodutivo .....	107
2.2. Design Experimental .....	108
2.3. Variáveis analisadas .....	108
2.3.1. Concentração espermática .....	109
2.3.2. Análise seminal computadorizada (CASA, ImageJ) .....	109
2.3.3. Integridade de membrana .....	110
2.3.4. Morfologia espermática .....	110
2.4. Análise estatística .....	111
<b>3. Resultados</b> .....	<b>111</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>117</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>120</b>
<b>Referências</b> .....	<b>121</b>

## INTRODUÇÃO

A piscicultura continental é o ramo da aquicultura que apresentou crescimento de 5,81% em 2023 em relação ao ano anterior e, entre os grupos de peixes nativos mais produzidos no país, o grupo representado pelos peixes redondos pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e patinga (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachipomus*) teve crescimento de 4,27% (IBGE, 2024). Este grupo de peixes se destaca por apresentar rusticidade e precocidade, contribuindo para o crescimento comercial das principais espécies nativas do Brasil em algumas regiões. Além disso, o hábito alimentar onívoro dos redondos (CASTAGNOLLI E ZUIM, 1985) é considerado uma oportunidade para o crescimento do setor, devido ao menor custo de produção em todas as fases de produção.

Os peixes nativos de maior produção no Brasil são predominantemente reofílicos, ou seja, na natureza, necessitam realizar a migração em direção às cabeceiras dos rios para que ocorra a reprodução. Por outro lado, quando em condições controladas em laboratório, precisam ser submetidos a protocolos de indução hormonal para se reproduzirem. O desenvolvimento desses protocolos para a reprodução de peixes reofílicos em laboratório teve início na década de 1930, mas o sucesso significativo foi alcançado apenas a partir da década de 1970 (ZANIBONI-FILHO E WEINGARTNER, 2007). Apesar de amplamente utilizado, o protocolo atual para reprodução de espécies reofílicas permanece similar ao desenvolvido inicialmente, com ainda poucas informações detalhadas sobre sua eficácia em diversas espécies, incluindo *P. mesopotamicus*. Além disso, a definição de parâmetros reprodutivos específicos, bem como manejos zootécnicos que otimizem o processo reprodutivo destas espécies, como por exemplo a viabilidade de coletas sucessivas de gametas durante o mesmo período reprodutivo ainda são pontos que precisam de maiores esclarecimentos.

O método por muito tempo utilizado para estimar a qualidade seminal foi a avaliação subjetiva da motilidade dos espermatozoides (RURANGWA et al., 2004; GALLEGO E ASTURIANO, 2018). Neste método, uma gota de sêmen é posicionada ao lado de uma gota de água destilada em uma lâmina e homogeneizadas concomitantemente ao início da contagem de tempo em cronômetro. Desta forma, o avaliador é capaz de aferir o vigor e a motilidade espermática de maneira subjetiva (FAUVEL, SUQUET E COSSON, 2010). Este

método depende da experiência em aferição espermática do avaliador, considerado como instrumento de medição de cada avaliador, cujo treinamento e a experiência prévia deste podem influenciar nos resultados obtidos (GALLEGO et al., 2018). Nesta forma de avaliação, apenas uma pessoa fica responsável em analisar todas as amostras, uma vez que ao mudar o avaliador corre-se o risco de perder o padrão de aplicação de escores e, cria-se uma variável interferente quando se deseja comparar resultados (VIVEIROS et al., 2010). Sendo assim, métodos de análise de sêmen computadorizada assistida (CASA) vêm ganhando espaço para estas avaliações.

Além da necessidade de aprimorar as técnicas de avaliação seminal, outra questão relevante para a reprodução de peixes reofílicos é a viabilidade da indução hormonal múltipla em um mesmo período reprodutivo. Esse tema tem sido investigado para diferentes espécies (PIRES et al., 2017; PIRES et al., 2018; SPICA et al., 2021), uma vez que a quantidade de reprodutores vivos disponíveis em laboratórios de reprodução é limitada e há a possibilidade de maximizar a utilização de machos com bom potencial genético. Essa estratégia propõe aumentar a produtividade de alevinos em uma única estação reprodutiva e, conseqüentemente, trazer maior retorno econômico ao produtor.

Nesse contexto, a busca por alternativas que promovam simultaneamente a manutenção e o desempenho reprodutivo dos machos se torna essencial. A tecnologia de bioflocos (BFT) destaca-se como uma estratégia promissora para otimizar esses parâmetros em laboratórios de reprodução de peixes. Estudos demonstram que o uso de BFT pode promover melhorias significativas, como o aumento das taxas de fecundidade e a produção de larvas (EKASARI et al., 2013). Além disso, reprodutores mantidos em BFT podem aproveitar os bioflocos como alimento constantemente disponível como complemento nutricional (EKASARI et al., 2015). Portanto, a adoção de sistemas de tecnologia de bioflocos se mostra uma alternativa relevante para potencializar as características seminais de machos de *P. mesopotamicus*, criando um ambiente que favorece uma melhor qualidade e viabilidade do sêmen.

Outra técnica que beneficia o setor de reprodução de peixes, permitindo a preservação e utilização dos gametas masculinos em fertilizações assistidas, é a conservação de células espermáticas. Essa abordagem busca superar limitações da reprodução natural, como a assincronia reprodutiva entre machos

e fêmeas, além de viabilizar programas de melhoramento genético e conservação de espécies ameaçadas. O sêmen armazenado sob refrigeração mantém motilidade espermática adequada por até 48 horas, especialmente quando diluentes específicos, como a água de coco em pó (ACP-104), são utilizados (Viveiros et al., 2014; Oliveira, 2012). Diante desses aspectos, compreender a influência da tecnologia de bioflocos (BFT) no retorno reprodutivo de machos, bem como nos processos de resfriamento do sêmen em espécies neotropicais sul-americanas, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), é fundamental para impulsionar o desenvolvimento do setor.

## CAPÍTULO I – Revisão de Literatura

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. O pacu (*P. mesopotamicus*) na piscicultura do Brasil

De acordo com o IBGE, em 2023, o cultivo de peixes no Brasil apresentou crescimento de 5,81% em relação ao ano anterior, 655.303 toneladas de peixes de cultivo (IBGE, 2024). O crescimento constante da piscicultura no país é evidente mesmo com desafios climáticos, econômicos e sanitários enfrentados nos últimos anos pelos piscicultores.

Dentre as espécies mais produzidas, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) representou 67,5%, com uma produção de 442,2 mil toneladas, enquanto a produção de camarão-branco-do-Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) foi de 127,5 mil toneladas no ano de 2023, correspondendo a 19,4% do total (IBGE, 2024). Ambas são espécies exóticas que se destacam na aquicultura brasileira devido à sua notável adaptabilidade a diferentes condições ambientais como temperatura e salinidade, excelente desempenho em sistemas de cultivo intensivo e à alta aceitação no mercado consumidor (Bessa-Junior et al., 2012; Santos et al., 2006).

O grupo de peixes nativos mais produzidos no Brasil é o grupo formado pelos peixes redondos, que são peixes de água doce caracterizados principalmente por seu corpo arredondado ou discoide e geralmente comprimido lateralmente. Dentre eles, estão o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e pirapitinga (*Piaractus brachipomus*) e seus híbridos tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*), tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachipomus*) e pirapitinga (*P. mesopotamicus* x *P. brachipomus*). Em 2023, o total da produção de peixes redondos foi de 164.295 toneladas, o que representa crescimento de apenas 1,43% enquanto a produção específica de pacu e patinga passou de 7.427 toneladas em 2022 para 7.744 toneladas em 2023, representando um crescimento de 4,27% (IBGE, 2024) (Figura 1).

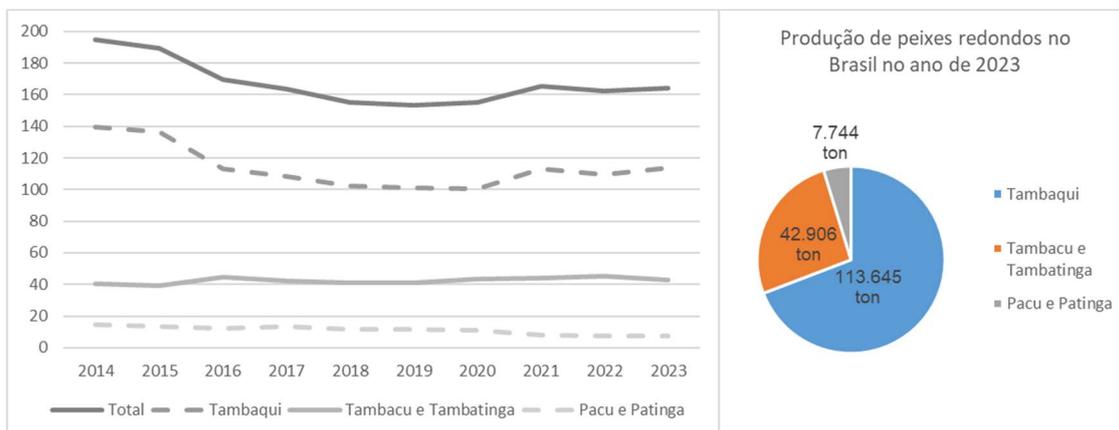


Figura 1. Produção de peixes redondos no Brasil nos anos de 2014 a 2023 (IBGE, 2024).

No Brasil, os estados de Rondônia e Mato Grosso destacam-se na produção de peixes redondos, principalmente o tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo Rondônia o principal produtor nacional de peixes nativos (PEIXEBR, 2025). Muito embora Rondônia seja o grande produtor de peixes redondos, sua produção de *P. mesopotamicus* é pouco significativa, totalizando 264 mil toneladas no ano de 2023, enquanto houve destaque na produção de *P. mesopotamicus* para os estados do Paraná (1.830 mil toneladas), Maranhão (1.798 mil toneladas) e São Paulo (1.679 mil toneladas) (IBGE, 2024). No entanto, informações específicas sobre a exportação de peixes redondos para países como Argentina, Paraguai e Uruguai são limitadas. Embora *P. mesopotamicus* seja requisitado no mercado nacional e internacional (AGRO20, 2020), detalhes sobre os principais estados exportadores e destinos específicos não estão amplamente disponíveis.

*Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887; Figura 2) é encontrado em grande escala no Pantanal e bacia do Prata (Figura 3), pertence à Classe Osteichthyes, Ordem Characiformes, Família Characidae (BRITSKI et al., 2007) e é também conhecido como pacu-caranha, caranha, pacu-guaçu (SUGANUMA, 2008), espécie dispersora de sementes e por esse motivo apresenta grande importância para a conservação das matas ciliares (ALENCAR et al., 2013).



Figura 2. Exemplar de juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Fonte: Autoria própria).

Esta espécie possui hábito alimentar onívoro, e explora uma gama bastante diversificada de alimentos em função da sazonalidade de ocorrência dos mesmos, em condições naturais de crescimento (BICUDO, 2008). Em decorrência de sua alimentação, *P. mesopotamicus* possui uma dentição particular na forma de dentes molariformes grandes multicuspidados, especialmente adaptados para quebrar e esmagar frutos e sementes, que compõem sua alimentação na fase adulta (RESENDE et al., 1998). As larvas, por sua vez, são planctívoras e se alimentam principalmente de cladóceros (FREGADOLLI, 1993; MARQUES et al., 2007; SIPAÚBA-TAVARES E BRAGA, 1999).



Figura 3. Distribuição geográfica do *Piaractus mesopotamicus* ao longo das bacias do Prata e Pantanal na América do Sul (Fonte: Autoria própria).

Características como rusticidade, crescimento acelerado, precocidade, boa adaptação aos sistemas de cultivo e carne de boa aceitação comercial (DIAS-KOBERSTEIN, CARNEIRO E URBINATI, 2005; FRESNEDA et al., 2004). Estas características estimularam pesquisadores a desenvolverem pacotes tecnológicos que fomentassem maior produtividade no cultivo dessa espécie (CASTAGNOLLI E ZUIM, 1985; PEZZATO et al., 1995).

Os reprodutores dessa espécie migram rio acima para liberar seus gametas, fenômeno conhecido como piracema, que geralmente ocorre entre outubro e março (ROMAGOSA, PAIVA E GODINHO, 1988), cujo pico ocorre em janeiro (COSTA E MATEUS, 2009). As fêmeas liberam os oócitos em grande quantidade e em uma única desova (desova total), sendo a fecundação externa e sem cuidado parental (LIMA et al., 2013).

Quando em ambiente de cultivo, a ausência de fatores ambientais que estimulam a piracema, resulta em bloqueios no ciclo gonadal, sendo necessária a indução hormonal para que haja reprodução artificial (LIMA et al. 1991). Dentre os indutores reprodutivos mais utilizados na reprodução artificial de espécies nativas brasileiras, está o extrato bruto de hipófise de carpa (EHC), cujo mecanismo de ação envolve a maturação final e liberação dos gametas (ZANIBONI FILHO E WEINGARTNER, 2007).

### *1.2. Reprodução de machos reofílicos*

A maioria dos peixes migratórios de águas lólicas (GODINHO et al., 2010) formam cardumes durante a estação de cheia, nadando longas distâncias rio acima, desde locais de alimentação até os locais de desova. Esses peixes apresentam alta fecundidade, depositam ovos de movimentação livre na coluna d'água e não oferecem cuidado parental. Muitas espécies produzem ovos demersais, quase neutros em flutuabilidade (GODINHO et al., 2010), cujo desenvolvimento embrionário é rápido enquanto derivam rio abaixo. As larvas migram para áreas marginais, como planícies aluviais, onde encontram alimento abundante (plâncton) e proteção contra predadores (GODINHO et al., 2010; GODOY, 1975).

Durante a piracema fatores como temperatura, fotoperíodo e pluviosidade aumentados ativam o desenvolvimento e a maturação gonadal (ZOHAR et al.,

2010). O hipotálamo integra esses sinais externos e libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, promovendo a produção de hormônios esteroides nos testículos e ovários (ZOHAR et al., 2022).

A espermatogênese é regulada pelos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que atuam respectivamente na formação de espermatozoides nos túbulos seminíferos e na secreção de testosterona pelas células de Leydig (BALDISSEROTTO, 2013; HAFEZ, 1995; Figura 4). Os esteroides sexuais, como androgênios e estrogênios, desempenham papel crucial na regulação reprodutiva e podem ser utilizados, de forma natural ou sintética, na aquicultura (SENTHILKUMARAN E KAR, 2021; YOUSEFIAN E MOUSAVI, 2011).

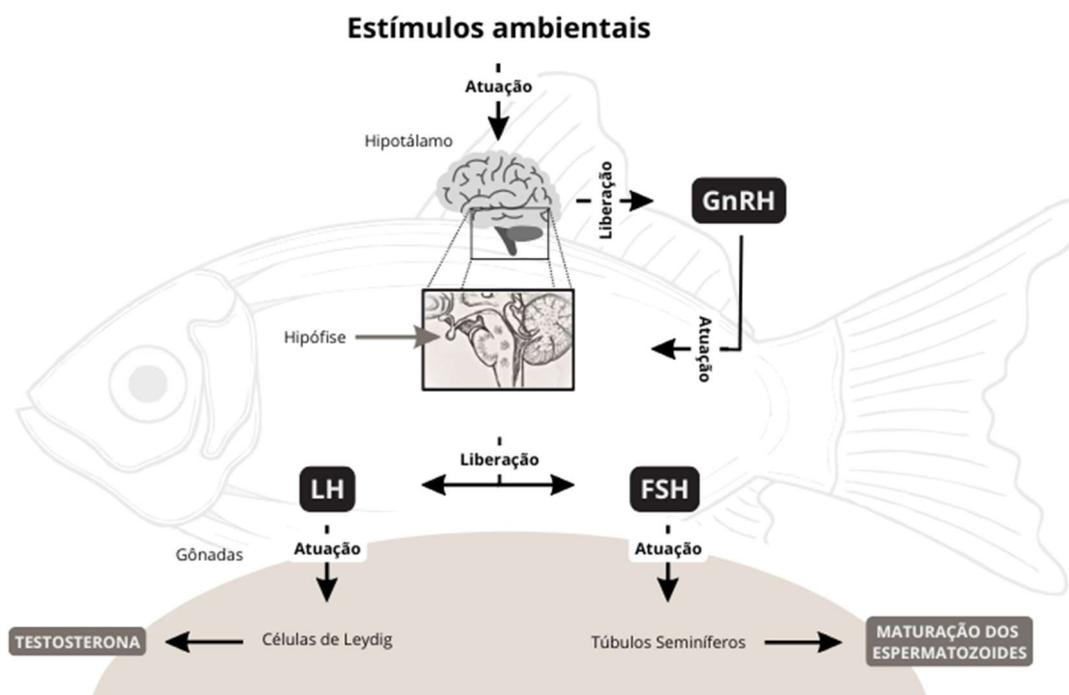


Figura 4. Desenho esquemático dos processos hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas na espermatogênese de machos de peixes (Fonte: Autoria própria).

Em laboratórios de reprodução, a ausência desses estímulos ambientais inibe o amadurecimento e liberação dos gametas, sendo necessária a implementação de protocolos de indução hormonal para viabilizar a reprodução

em condições artificiais. Técnicas de indução hormonal foram desenvolvidas desde a década de 1930 por Rodolfo Von Ihering, com resultados positivos na maturação final de gônadas e ovulação do curimatã-pacu (*Prochilodus argentinensis*) através do uso de hormônios da hipófise de peixes sexualmente maduros (ZANIBONI-FILHO E WEINGARTNER, 2007).

### 1.2.1. Seleção de reprodutores

A seleção dos reprodutores é realizada quando os machos atingem a maturidade sexual, com idade superior a dois anos e comprimento de aproximadamente 40,2 cm (BARBOSA et al., 2022; GOMES et al., 2010). Os machos são identificados pela liberação de sêmen com coloração branca, consistência densa e fluxo abundante após leve pressão abdominal, enquanto as fêmeas apresentam abdômen abaulado e macio na região posterior, papila genital proeminente e avermelhada (Kubitza, 2004).

No laboratório, os reprodutores são identificados individualmente através do uso de fios de *nylon* coloridos amarrados ao primeiro raio da nadadeira dorsal ou microchips aplicados na base da nadadeira dorsal (intramuscular). Após a identificação, os reprodutores são pesados individualmente para determinação da dosagem hormonal. Em seguida, os peixes são separados de acordo com o sexo e alocados separadamente por sexo em caixas de polietileno ou tanques com fluxo contínuo de água, com vazão de 1,5 L/min por quilograma de peixe, assegurando condições ótimas para sua manutenção (CASTAGNOLLI, 1992; RAMOS E RAMOS, 1996).

### 1.2.2. Manejo de indução hormonal

Hormônios são substâncias químicas que comunicam mensagens entre células-alvo, estimulando processos bioquímicos que resultam em respostas biológicas específicas (ELAKKANAI et al., 2015). Na aquicultura, os hormônios são amplamente utilizados para reprodução artificial e reversão sexual, sendo por vezes essenciais para a produção de alevinos de qualidade e ganho de peso em espécies de interesse comercial (KIM et al., 2022).

Os principais agentes utilizados incluem LHRH análogo, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e extrato bruto de hipófises de carpa desidratadas (EBHC). Este último é preparado através da maceração das hipófises em

porcelana, diluição em solução fisiológica e conservação com glicerina. A aplicação dos hormônios ocorre após a seleção de matrizes aptas à reprodução, acelerando processos hormonais nas células germinativas em maturação (BALDISSEROTTO, 2013).

O uso de hormônios na indução reprodutiva de peixes apresenta vantagens e desvantagens específicas. A Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) tem sido utilizada como alternativa, apresentando eficácia em algumas espécies. Contudo, sua estrutura molecular distinta das gonadotrofinas de peixes exige doses elevadas para estimular a maturação, tornando o processo economicamente inviável, enquanto análogos sintéticos do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (LHRH) oferecem vantagens significativas, como a atuação no início da cadeia hormonal, estimulando a síntese endógena de gonadotrofinas, e a ausência de especificidade de espécie, permitindo sua aplicação em diversas espécies de peixes (LOIOLA, 2010). Além disso, são moléculas simples, estáveis, eficazes em pequenas dosagens e economicamente viáveis. Entretanto, em algumas espécies, podem apresentar desvantagens, como o tempo prolongado para ovulação. O EBHC é amplamente utilizado devido à sua eficácia comprovada na indução da maturação final dos oócitos e ovulação em peixes reofílicos. No entanto, por ser um produto biológico artesanal, pode representar riscos de veiculação de doenças e enfrenta restrições por órgãos reguladores (OLIVEIRA, 2021).

Diversos protocolos de indução hormonal têm sido investigados como alternativas ou complementos ao método tradicional que utiliza extrato de hipófise de carpa em peixes (BATLOUNI et al., 2025). Testes com indutores alternativos foram conduzidos em diferentes espécies de peixes migratórios neotropicais sul-americanos (*Brycon orbignyanus* - buserelina, PAULINO et al., 2011; *L. marmoratus* - análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas de mamíferos e metoclopramida – Ovopel, ARAÚJO et al., 2014; *Leporinus obtusidens* – gonadorelina, BERNARDES JR. et al., 2017; *Colossoma macropomum* – Ovopel, MARTINS et al., 2017; *Brycon cephalus* – Ovopel, BASHIYO-SILVA et al., 2015; *Leporinus macrocephalus* - análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas de mamíferos e metoclopramida – Conceptal, PEREIRA et al., 2017; *Leporinus elongatus* - Conceptal, PEREIRA et al., 2018; *C. macropomum* – Ovopel, SOUZA et al., 2018; *C. macropomum* – buserelina,

KOZEN-FREITAS et al., 2020; *Leporinus fredereci* - análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas de mamíferos e metoclopramida, SOUZA et al., 2020; *Astyanax altiparanae* - análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas de salmonídeos, ROZA DE ABREU et al., 2021; *A. altiparanae* – análogos do hormônio liberador de LHRH e domperidona, ROZA DE ABREU et al., 2022) além de estudos demonstrando resultados promissores, como a aplicação de prostaglandinas em associação ao protocolo convencional com EBHC em *P. mesopotamicus* (CRISCUOLO-URBINATI et al., 2012).

Os protocolos sugerem doses específicas para indução hormonal, como a posologia de 5,5 mg/kg de EBHC para fêmeas, dividida em duas aplicações com intervalo de 12 horas, e de 2,5 mg/kg de EBHC para machos em aplicação única simultânea à segunda dose das fêmeas (WOYNAROVICH E HORVÁTH, 1983), porém, esses protocolos variam drasticamente dependendo da rotina utilizada em cada laboratório. A ovulação geralmente ocorre entre 240 e 270 horas-grau, dependendo da temperatura e outros fatores ambientais (ALCÂNTARA E BERNARDINO, 1988; CECARELLI, SENHORINI E VOLPATO, 2000). Pesquisas a fim de otimizar protocolos de indução hormonal e garantir resultados consistentes na reprodução de peixes ainda são necessários.

### 1.3. Análise seminal em peixes

A análise das características qualitativas e quantitativas do sêmen em peixes é essencial para o sucesso da reprodução assistida e o aprimoramento da piscicultura. A qualidade do sêmen está diretamente ligada à taxa de fertilização e ao desenvolvimento embrionário, tornando indispensável a avaliação precisa dos parâmetros seminais para selecionar reprodutores e melhorar a eficiência da produção de alevinos (RURANGWA et al., 2004; FAUVEL, SUQUET E COSSON, 2010; GALLEGO E ASTURIANO, 2018).

Entre os parâmetros quantitativos mais relevantes estão o volume seminal, a concentração espermática e a produção total de espermatozoides. Esses fatores variam entre espécies e são influenciados por condições ambientais e manejo reprodutivo (MURGAS et al., 2011). A concentração espermática, por exemplo, indica o número de espermatozoides por mililitro de sêmen, sendo um

fator crítico para determinar a capacidade reprodutiva do macho (FELIZARDO et al., 2010; SANCHES et al., 2011).

Os valores observados na literatura para as características quantitativas do sêmen variam devido às diferentes metodologias de indução aplicada nos estudos. Outros fatores importantes também são responsáveis em influenciar as características quantitativas do sêmen como nutrição, fator de condição corporal e idade do animal. Carvalho et al. (2014) encontrou valores de volume seminal de 2,9 mL ao induzir *P. mesopotamicus* com 2,5 mg de EHC por kg de peixe, enquanto Sanches et al. (2011) encontrou valores entre 9,5 e 13,6 mL com a mesma dosagem, utilizando peixes de tamanhos semelhantes e induzindo os animais dentro do período reprodutivo, o que evidencia essa influência que os diversos fatores ambientais geram nessa característica.

De maneira geral, os valores de volume seminal em *P. mesopotamicus* se situam entre 0,92 e 18,83 mL (FOGLI DA SILVEIRA, 1990; STREIT JR. et al., 2005; VIVEIROS E GODINHO, 2009; SANCHES et al., 2011; SOUZA, 2012; CARVALHO et al., 2014; KURADOMI et al., 2016; MORAIS et al., 2018; SOUZA, 2022; SPICA et al., 2025) enquanto valores de concentração espermática variam de forma mais acentuada, com observações na literatura entre  $1,39 \times 10^6$  e  $6,94 \times 10^{10}$  para a espécie (FOGLI DA SILVEIRA, 1990; STREIT JR. et al., 2005; VIVEIROS E GODINHO, 2009; POVH et al., 2010; SANCHES et al., 2011; SOUZA, 2012; CARVALHO et al., 2014; KURADOMI et al., 2016; MORAIS et al., 2018; TEODOZIA et al., 2020; SPICA et al., 2024; SPICA et al., 2025), evidenciando quão sensível à alterações no ambiente, assim como aos fatores ligados ao próprio reprodutor, é essa característica específica.

No aspecto qualitativo, destacam-se a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, a morfologia espermática e a atividade mitocondrial. A motilidade, ou capacidade de movimentação dos espermatozoides, é um indicador fundamental de sua viabilidade e potencial para alcançar o óvulo. Espermatozoides com membranas danificadas ou morfologia anormal, assim como baixa atividade mitocondrial, tendem a apresentar menor mobilidade e menor sucesso reprodutivo (COSSON et al., 1999; AITKEN E KRAUSZ, 2001; MILIORINI, 2006; AMANN E KATZ, 2004).

Para *P. mesopotamicus* é possível encontrar alguns trabalhos que avaliaram essas características. Valores altos de taxa de células com membrana íntegra

entre 80,4 e 100% (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1990; SOUZA, 2012; MORAIS et al., 2018; TEODOZIA et al., 2020; SPICA et al., 2024; SPICA et al., 2025), valores de taxa de espermatozoides morfologicamente normais variam entre 40,21 e 67,6% (STREIT JR. et al., 2005; STREIT JR. et al., 2006b; STREIT JR. et al., 2009; SOUZA, 2012; GALO et al., 2019; SPICA et al., 2024), e por fim, Spica et al., 2025 observou valores para taxa de células com alto potencial mitocondrial entre 15,08 e 34,25%.

A introdução de tecnologias como o sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) trouxe maior precisão à análise seminal. Esse sistema permite avaliar parâmetros cinéticos, como velocidade e linearidade do movimento, além de características morfológicas e concentração espermática de forma padronizada, reduzindo a subjetividade das análises visuais tradicionais (FAUVEL, SUQUET E COSSON, 2010; PURCHASE E EARLE, 2012).

Independente da metodologia de análise (objetiva ou tradicional), os valores de motilidade espermática para *P. mesopotamicus* são próximos a 90%. Ao avaliar a motilidade de maneira tradicional, é possível encontrar valores que flutuam entre 75 e 100% (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1990; MARIA et al., 2004; STREIT JR. et al., 2004; STREIT JR. et al., 2005; STREIT JR. et al., 2006a; STREIT JR. et al., 2006b; SANCHES et al., 2011; SOUZA, 2012; CARVALHO et al., 2014; KURADOMI et al., 2016; GALO et al., 2019). Ao se avaliar a motilidade a partir do sistema CASA, de maneira objetiva, foram encontrados valores comparativamente maiores, entre 86,57 e 98,7% (TEODOZIA et al., 2020; SOUZA, 2022; SPICA et al., 2024; SPICA et al., 2025).

A Análise seminal é uma ferramenta indispensável para otimizar a reprodução de peixes em ambiente de cultivo. A compreensão dos fatores que influenciam a qualidade do sêmen e o uso de métodos avançados de avaliação contribuem para o desenvolvimento de protocolos mais eficazes, promovendo a sustentabilidade e a produtividade na piscicultura.

#### 1.4. Retorno reprodutivo

Na produção de juvenis de peixes reofilicos sul-americanos, os reprodutores geralmente são utilizados apenas uma vez durante o período reprodutivo. Contudo, a literatura registra casos excepcionais, como o uso repetido de machos e fêmeas de *C. macropomum* (PIRES et al., 2017; PIRES et

al., 2018), machos de *L. marmoratus* (SPICA et al., 2021) e machos de *P. mesopotamicus* (KURADOMI et al., 2015) no mesmo período reprodutivo. Essa reutilização de reprodutores representa uma estratégia promissora para aumentar a sustentabilidade na aquicultura, reduzindo a pressão sobre os estoques naturais e promovendo a conservação das populações selvagens, uma vez que reduz o número de reprodutores necessários.

Além dos benefícios ambientais, o uso eficiente de recursos em sistemas aquícolas intensivos também contribui para atender às crescentes demandas por pescado sem comprometer o equilíbrio ambiental. No entanto, para que essa prática se torne viável em escala comercial, é necessário superar desafios específicos, como a variabilidade genética individual na capacidade de retorno reprodutivo dos machos. Essa variabilidade pode ser influenciada por fatores genéticos e fisiológicos, bem como pelo manejo inadequado de condições ambientais, incluindo temperatura, qualidade da água e protocolos hormonais.

Para compreender melhor os mecanismos que viabilizam a reutilização de reprodutores, é fundamental explorar as fases do ciclo reprodutivo das gônadas dos teleósteos, que são influenciadas por fatores como espécie, genética e condições ambientais. Segundo Brown-Peterson et al. (2011), os testículos dos peixes podem ser classificados em quatro fases distintas: (i) imaturo, caracterizado por estruturas pequenas e translúcidas, contendo apenas espermatogônias indiferenciadas; (ii) em desenvolvimento, fase inicial de crescimento com espermatogênese e formação de espermatocistos; (iii) apto à liberação de esperma, com testículos grandes, firmes e opacos, liberando espermatozoides com leve pressão abdominal; e (iv) em regressão, marcados por estruturas flácidas, ausência de liberação de esperma e início da regeneração do epitélio germinativo. Nakaghi et al. (2003) destacaram que a proliferação de espermatogônias nos túbulos seminíferos após a extrusão, quando associada à indução hormonal, é um fator crucial para o retorno dos machos ao ciclo reprodutivo.

Com base nesses aspectos fisiológicos, a reutilização de machos durante um mesmo período reprodutivo apresenta vantagens econômicas e produtivas. Essa abordagem permite a exploração de reprodutores com maior valor genético, reduzindo a necessidade de manter um plantel numeroso e economizando recursos como ração e espaço. Além disso, ela intensifica a

produção de alevinos durante a estação reprodutiva, otimizando os recursos disponíveis.

Apesar do seu potencial, a prática ainda carece de estudos que investiguem as condições ideais para sua implementação e os impactos em larga escala. Pesquisas são essenciais para avaliar os parâmetros necessários para o manejo adequado e para mitigar os desafios associados, possibilitando a adoção dessa estratégia em diferentes sistemas produtivos.

### *1.5. Tecnologia de bioflocos na reprodução de peixes*

O biofoco consiste em agregados de microrganismos, incluindo bactérias, zooplânctons e fitoplânctons, aderidos à matéria orgânica em suspensão. Sua formação depende da adição de fontes de nitrogênio e carbono, que estimulam o desenvolvimento de comunidades microbianas, especialmente bactérias heterotróficas e quimioautotróficas (ABAKARI, LUO E KOMBAT, 2021; EMERENCIANO et al., 2013a).

O processo de formação ocorre a partir da alimentação dos peixes ou camarões com rações ricas em proteínas e outros nutrientes. O nitrogênio liberado pela excreção dos animais, após a digestão das proteínas, é assimilado por bactérias heterotróficas e nitrificantes, que o utilizam para formar biomassa microbiana. Paralelamente, fitoplânctons e zooplânctons crescem ao consumir restos de matéria orgânica e carbono disponível para produção de energia e crescimento. A adição de fontes de carbono (como açúcar, melão em pó, melão líquido ou amido) deve ser feita de modo balanceado em relação ao nitrogênio, em geral com proporção de C:N inicial entorno de 20:1 para maturação da BFT (e maior ação das bactérias heterotróficas) e, posteriormente, com o sistema maturado (nitrogênio amoniacal total e nitrito <1 mg/L; presença de nitrato e de sólidos sedimentáveis; e maior ação das bactérias quimioautotróficas) a proporção é ajustada para uma relação entorno de 6:1 para manutenção da BFT (EBELING et al., 2006).

Esse equilíbrio favorece a remoção de compostos nitrogenados potencialmente tóxicos, mediada por bactérias quimioautotróficas, o que melhora a qualidade da água. Além disso, a biomassa microbiana formada, composta por organismos aeróbicos, serve como fonte nutricional complementar para os peixes e camarões, reduzindo a necessidade de ração comercial

(AVNIMELECH, 1999; AZIM E LITTLE, 2008; EMERENCIANO, GAXIOLA E CUZON, 2015).

Os flocos microbianos (Figura 5) resultantes apresentam elevado teor de proteínas e lipídios, o que os torna uma alternativa nutricional viável para espécies filtradoras e onívoras. Ademais, algumas bactérias presentes podem atuar como probióticos, beneficiando a saúde dos organismos cultivados (RAMÍREZ-NÚÑEZ et al., 2019).

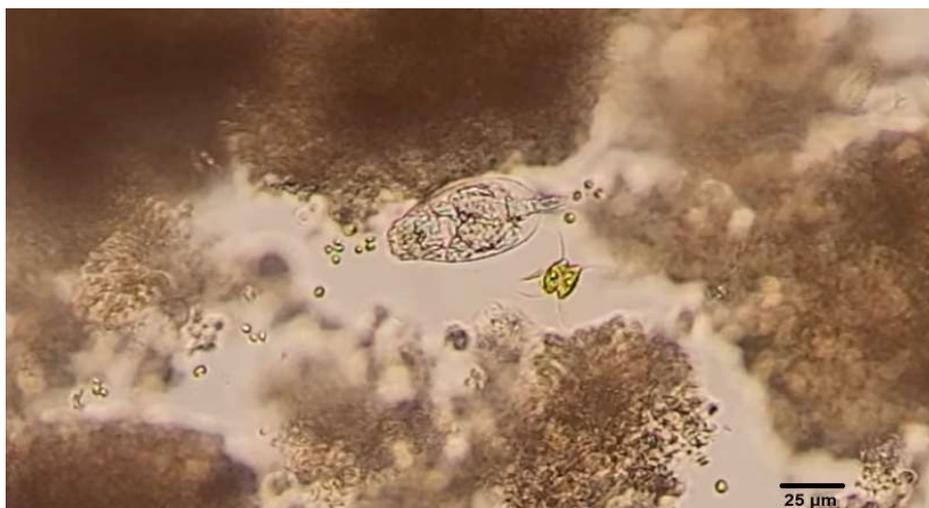


Figura 5. Microscopia de amostra de água de sistema de tecnologia de bioflocos com presença de flocos, fitoplâncton e zooplâncton (Fonte: Autoria própria).

A adoção de tecnologias de produção mais sustentáveis do ponto de vista ambiental tem ganhado atenção crescente. A tecnologia de bioflocos (BFT) é um exemplo notável, pois minimiza ou elimina a necessidade de troca de água, enquanto os agregados microbianos (bioflocos) formados no sistema podem ser consumidos pelos peixes (EMERENCIANO et al., 2017), atuando como fonte alimentar extra e de alto valor nutricional e atuam na melhora da resposta imune (MANSOUR E ESTEBAN, 2017; VAN DOAN et al., 2021; KHANJANI, SHARIFINIA E HAJIREZAEI, 2022; HARAZ et al., 2023; YU et al., 2023).

Com o uso da BFT é possível obter um melhor controle sobre a preparação dos reprodutores, provavelmente devido aos benefícios nutricionais (CRAB et al., 2007; AVNIMELECH E KOCHBA, 2009) e maior estabilidade nas variáveis de qualidade da água proporcionado pelo sistema de bioflocos (KUMAR et al., 2018). Alguns trabalhos têm avaliado o desempenho de *P.*

*mesopotamicus* em bioflocos, indicando resultados promissores para essa espécie (BRAGA et al., 2018; PELLEGRIN et al., 2021; MACHADO et al., 2021; SGNAULIN et al., 2021; PIRES et al., 2022; DA ROCHA et al., 2025a; DA ROCHA et al., 2025b).

Estudos recentes destacam os benefícios da BFT na reprodução de diversas espécies. A manutenção de reprodutores em BFT tem demonstrado melhora nos aspectos reprodutivos e/ou facilitado a produção de juvenis de peixes, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*; EKASARI et al., 2015; ALVARENGA et al., 2017) e o bagre africano (*Clarias gariepinus*; EKASARI et al., 2016). Além disso, essa tecnologia tem favorecido a reprodução de camarões marinhos (EMERENCIANO et al., 2014; EMERENCIANO et al., 2013b; CARDONA et al., 2016) e proporcionado resultados positivos em algumas espécies de peixes Neotropicais Sul-Americanos, como o lambari (*Astyanax lacustris*; LIMA, 2022; VALANDRO, 2023).

Entretanto, a BFT exige atenção, especialmente nos seguintes pontos críticos: (i) a oxigenação contínua do sistema é indispensável, pois a interrupção por períodos curtos pode levar ao colapso do sistema e à mortalidade dos peixes, tornando essencial o uso de geradores em casos de queda de energia; e (ii) é necessário monitoramento constante da qualidade da água, com destaque para níveis baixos de nitrogênio amoniacal total e nitrito, altos níveis de alcalinidade (acima de 100 mg/L) e controle de sólidos sedimentáveis. A presença de nitrato em concentrações entre 25 e 50 mg/L é um indicativo de bom funcionamento do sistema, resultado da atividade de bactérias nitrificantes (EMERENCIANO et al., 2017).

Além de ser uma ferramenta promissora para a reprodução de peixes, a BFT atende às demandas por sustentabilidade ao reduzir ou eliminar trocas de água no cultivo (EMERENCIANO et al., 2017). Essa característica reforça a relevância da tecnologia e justifica a necessidade de ampliar os investimentos em pesquisas que explorem seus mecanismos e efeitos sobre a reprodução e a produção de diferentes espécies de peixes Neotropicais Sul-Americanos. Entretanto, embora a BFT tenha proporcionado sucesso reprodutivo em espécies como camarões marinhos e tilápias, seu potencial na manutenção de reprodutores de peixes Neotropicais Sul-Americanos ainda é pouco explorado, exigindo mais estudos para consolidar sua aplicação e otimização.

### *1.6. Conservação de células espermáticas*

A criopreservação de sêmen de peixes é uma biotécnica essencial para a preservação e utilização dos gametas masculinos em fertilizações assistidas. Esse processo permite superar limitações da reprodução natural, como a assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, ao mesmo tempo que viabiliza programas de melhoramento genético e conservação de espécies ameaçadas. As técnicas de conservação de gametas mais utilizadas são o resfriamento e a congelação, ambos associados ao uso de diluentes e, no caso da congelação, de crioprotetores, para reduzir os danos causados às células espermáticas pela exposição ao frio extremo.

O resfriamento preserva o sêmen em temperaturas de refrigeração por períodos curtos, e a congelação mantém os gametas em nitrogênio líquido para armazenamento prolongado. O resfriamento é indicado para uso imediato em programas de reprodução, enquanto a congelação oferece maior flexibilidade temporal e espacial para o manejo genético e reprodutivo. Ambos os métodos dependem da escolha de diluentes apropriados para minimizar o metabolismo espermático e evitar contaminações microbianas. Na congelação, a presença de crioprotetores, como o dimetilsulfóxido e a glicerina, é indispensável para prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares, que podem causar danos irreparáveis às células (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014; VIVEIROS et al., 2014).

Estudos apontam que o sêmen mantido em temperaturas de refrigeração apresenta motilidade espermática adequada por até 48 horas, especialmente quando diluentes específicos, como água de coco em pó (ACP-104), são utilizados (VIVEIROS et al., 2014; OLIVEIRA, 2012). Além disso, o resfriamento dispensa a adição de crioprotetores na maioria dos casos, reduzindo custos e a exposição das células a potenciais toxinas. Em contraste, a congelação, apesar de permitir armazenamento a longo prazo, frequentemente causa danos estruturais e funcionais aos espermatozoides, devido à desidratação celular e ao impacto osmótico induzido pela criopreservação (MARIA, 2005; GRAHAM, 1996).

Outra vantagem do resfriamento é sua simplicidade operacional. Diferentemente da congelação, que requer equipamentos específicos e controle

rigoroso de temperatura, o resfriamento pode ser realizado com infraestrutura básica, como geladeiras convencionais. Isso torna a técnica mais acessível para piscicultores e projetos de conservação em regiões com recursos limitados. Por outro lado, a congelação, mesmo com suas limitações, é indispensável para a criação de bancos de germoplasma, essenciais para a conservação genética de espécies ameaçadas (GODINHO, 2007).

Em resumo, enquanto a congelação oferece soluções a longo prazo, o resfriamento destaca-se como uma alternativa prática e eficiente para a reprodução assistida e programas de manejo reprodutivo de curto prazo. A escolha entre os métodos deve considerar os objetivos do manejo, a infraestrutura disponível e as necessidades específicas das espécies em questão.

O processo de criopreservação e resfriamento de sêmen pode afetar diversas características espermáticas, como motilidade, integridade da membrana plasmática, vigor e morfologia, devido a vários fatores: (i) estresse térmico e osmótico - durante o congelamento e descongelamento, as células espermáticas são submetidas a mudanças abruptas de temperatura e concentrações de solutos, o que pode levar a danos estruturais e funcionais (FAHY, 1980; WATSON, 2000); (ii) formação de cristais de gelo - o congelamento pode resultar na formação de cristais de gelo intracelulares, que podem perfurar e danificar organelas e membranas celulares, comprometendo a integridade celular e (WATSON, 2000); (iii) estresse oxidativo - o processo de criopreservação pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à peroxidação lipídica e danos ao DNA espermático (GILLE E SINGLES, 1995; WILLIAMS E FORD, 2005).

Essa realidade deixa claro a importância de se observar a variação das características seminais quando submetidas ao processo de conservação, seja através da criopreservação, seja através do resfriamento. Spica et al., 2025 descreveu o comportamento das variáveis de sêmen de *P. mesopotamicus* e sua viabilidade ao longo de 24 horas de armazenamento sob refrigeração e concluiu que essa manutenção pode ser realizada por até 8 horas sem variação na qualidade, porém com queda significativa a partir das 16 horas de avaliação. Santana (1998) relata para *P. mesopotamicus* queda motilidade média de 23,75 % do sêmen, após 24 horas de resfriamento a 4°C. Millorini et al., 2002 encontrou

valores maiores de motilidade espermática de 58,33 % em 72 horas de resfriamento a 4°C do sêmen de *P. mesopotamicus* utilizando diluidores.

O resfriamento do sêmen é uma alternativa viável para a preservação temporária dos gametas, permitindo a manutenção das características espermáticas por algumas horas, dependendo das condições de armazenamento e do uso de diluentes adequados. No entanto, estudos indicam que, com o aumento do tempo de resfriamento, ocorrem quedas significativas na qualidade seminal, evidenciando a importância de se determinar os limites dessa técnica para cada espécie e condição de manejo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a tecnologia de bioflocos (BFT) no retorno reprodutivo de machos e resfriamento de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

### 2.2. Objetivos específicos

a) Caracterizar a qualidade seminal de peixes mediante avaliação de um sistema de análise seminal computadorizada assistida e análises complementares;

b) Comparar as características espermáticas em reproduções sucessivas de *P. mesopotamicus* mantidos sistemas com tecnologia de bioflocos e sistema tradicional com renovação de água.

c) Comparar a viabilidade do sêmen de *P. mesopotamicus* em diferentes tempos quando armazenado sob refrigeração ou temperatura ambiente, sem a utilização de diluidores.

## REFERÊNCIAS

- ABAKARI, G.; LUO, G.; KOMBAT, E. O. Dynamics of nitrogenous compounds and their control in biofloc technology (BFT) systems: A review. *Aquaculture and Fisheries*, v. 6, n. 5, p. 441–447, 2021.
- AGRO 20. Pacu: conheça os principais aspectos sobre esse peixe brasileiro. 2020. Disponível em: <https://www.agro20.com.br/pacu/>. Acesso em: 11 fev. 2025.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v. 122, n. 4, p. 497–506, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220497.22223>.
- ALCÂNTARA, R. C. G.; BERNARDINO, G. Banco de hipófises do Cepta: formulário de aquisição. Pirassununga: Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura, 1988. 39 p. (Documento interno).
- ALENCAR, S. S.; MUNIZ, C. C.; CASTRO, A. B.; MELLO, A. P.; RAMOS, K. C. R. Germinação de sementes de *Alibertia* sp. (Rubiaceae) recuperadas do trato digestório de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) na Estação Ecológica de Taiamã, Cáceres, Mato Grosso. In: ANAIS CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5ª (JC). Cáceres, MT, Brasil, 2013. v. 8.
- ALVARENGA, E. R.; SALES, S. C. M.; BRITO, T. S.; SANTOS, C. R.; CORRÊA, R. D. S.; ALVES, G. F. O.; MANDUCA, L. G.; TURRA, E. M. Effects of biofloc technology on reproduction and ovarian recrudescence in Nile tilapia. *Aquacultural Research*, v. 48, p. 5965–5972, 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13420>.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 3, p. 317–325, 2004.
- ARAÚJO, J. E. X. S.; STREIT JR., D. P.; ABREU, J. S.; MARTINS, E. F. F.; SOUZA, F. N.; OLIVEIRA, C. A. L.; et al. Ovopel and carp pituitary extract as spawning inducers in males of the Amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, p. 882-886, 2014.
- AVNIMELECH, Y.; KOCHBA, M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using <sup>15</sup>N tracing. *Aquaculture*, v. 287, p. 163–178, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>.

- AZIM, M. E.; LITTLE, D. C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 283, n. 1–4, p. 29–35, 2008.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3. ed. Santa Maria, RS: UFSM, 2013.
- BARBOSA, L. M.; COSTA, R. M. R.; MUNIZ, C. C.; MATEUS, L. A. F. Tamanho da primeira maturação de duas espécies de interesse pesqueiro na bacia do alto rio Paraguai – Mato Grosso: subsídios para o estabelecimento do tamanho mínimo de captura. *Revista Biodiversidade*, v. 21, n. 2, p. 46–57, 2022.
- BASHIYO-SILVA, C.; COSTA, R. S.; RIBEIRO, D. C.; SENHORINI, J. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Hormonal induction of *Brycon cephalus* (Characiformes, Characidae) to spermiation using D-ala6, pro9net-mGnRH + metoclopramide. *Zygote*, v. 24, p. 319-321, 2016.
- BATLOUNI, S.R.; CORRÊA FILHO, R.A.C.; KURADOMI, R.Y.; SPICA, L.N.; ROZA DE ABREU, M.; BRASILEIRO, L.O.; MOTTA, N.C.; DE JESUS-SILVA, L.M.; TEIXEIRA, S.A.; POVH, J.A. Maintenance and management of breeders of neotropical South American species in laboratories. In: Streit Jr., D.P.; Zhang, T.; Paredes, E. (Eds.). *Cryobiology for South American Neotropical fish species*. London: CRC Press, p. 142-170, 2025.
- BERNARDES JR., J. J.; BOMBARDELLI, R. A.; OLIVEIRA NUÑER, A. P. de. Gonadorelin increases semen production and does not affect its quality in *Leporinus obtusidens*. *Animal Reproduction Science*, v. 185, p. 154-160, 2017.
- BESSA-JUNIOR, A. P.; AZEVEDO, C. M. S. B.; PONTES, F. S. T.; HENRY-SILVA, G. G. Polyculture of Nile tilapia and shrimp at different stocking densities. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, n. 7, p. 1561–1569, 2012.
- BICUDO, A. J. A. Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos. 2008. 123 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 2008.
- BRAGA, L. C.; LOPES, P. R. S.; FORTUNATO, N. D.; LAVACH, F. L.; SILVA, P. G. C. G.; CÉSAR, J. P. T.; BUENO, V. P. S.; MACHADO, T. G. Influência de diferentes densidades de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) submetidos

- ao sistema de bioflocos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 28. Goiânia, Brasil, 2018.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal: manual de identificação. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2007. 230 p.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, v. 3, p. 52–70, 2011.
- CARDONA, E.; LORGEUX, B.; CHIM, L.; GOGUENHEIM, J.; DELLIOU, H.; CAHU, C. Biofloc contribution to antioxidant defence status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*, v. 452, p. 252–262, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.003>.
- CARVALHO, A. F. S.; MACHADO, M. R. F.; ANDRADE, E. S.; MURGAS, L. D. S.; ZANGERONIMO, M. G. Effect of caffeine added to the activating solution on sperm motility of fresh and thawed semen of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, and curimba, *Prochilodus lineatus*. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 45, n. 1, p. 75–81, 2014. <https://doi.org/10.1111was.12091>.
- CASTAGNOLLI, N. Piscicultura de água doce. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisa em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, 1992. p. 157–170.
- CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* - Berg, 1985. Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, 1985. 26 p. (UNESP-FCAV. Boletim Técnico 5).
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C., editor. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Vienna, IL: Cache River Press, 1999.
- COSTA, R. M. R.; MATEUS, L. A. F. Reproductive biology of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei: Characidae) in the Cuiabá River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, n. 3, p. 447–458, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000300012>.

- CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, v. 270, p. 1–14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>.
- CRISCUOLO-URBINATI, E.; KURADOMI, R. Y.; URBINATI, E. C.; BATLOUNI, S. R. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, v. 78, p. 2087-2094, 2012.
- DA ROCHA, G.H.; POVH, J.A.; BRASILEIRO, L.O.; SPICA, L.N.; SOUSA, R.M.; CLEVELAND, H.P.K.; MATHIAS, L. S. F. R.; FERREIRA, F. N.; ULLMANN, L. S.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; TEIXEIRA, S. A. Reference genes for gene expression studies in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in different culture systems. *Aquaculture International*, v. 33, p. 173, 2025a.
- DA ROCHA, G. H.; POVH, J. A.; SPICA, L. N.; BRASILEIRO, L. O.; DE SALVE, L. V.; MELO, M. L.; SOUSA, R. M.; CLEVELAND, H. P. K.; FERREIRA, R. M.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; TEIXEIRA, S. A. Comparative evaluation of biofloc technology (BFT) and RAS (recirculation aquaculture system) on growth performance, water quality, and innate immune response in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles. *Aquaculture*, 2025b.
- DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Tempo de trânsito gastrointestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 27, n. 3, p. 413–417, 2005.
- EBELING, J.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, v. 257, n. 1-4, p. 346-358, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.
- EKASARI, J.; RIVANDI, D. R.; FIRDAUSI, A. P.; SURAJIDJA, E. H.; ZAIRIN, Jr M.; BOSSIER, P.; DE SCHRYVER, P. Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. *Aquaculture*, v. 441, p. 72–77, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.019>.
- EKASARI, J.; SUPRAYUDI, M. A.; WIYOTO, W.; HAZANAH, R. F.; LENGGARA, G. S.; SULISTIANI, R.; ALKAHFI, M.; ZAIRIN, Jr M. Biofloc technology application in African catfish fingerling production: The effects on the

- reproductive performance of broodstock and the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*, v. 464, p. 349–356, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.013>.
- EKASARI, J.; ZAIRIN, Jr M.; PUTRI, D. U.; SARI, N. P.; SURAJIDJA, E. H.; BOSSIER, P. Biofloc-based reproductive performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. broodstock. *Aquacultural Research*, v. 46, n. 2, p. 509–517, 2013. <https://doi.org/10.1111/are.12185>.
- ELAKKANAI, P.; FRANCIS, T.; AHILAN, B.; KURUSU, N.; VELMURUGAN, A.; RAVICHANDRAN, S.; MURUGAN, M.; SHIVAPRAKASH, M.; MOHAN, C. V. Role of GnRH, HCG and Kisspeptin on reproduction of fishes. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 8, n. 17, 2015. <https://doi.org/10.17485/ijst/2015/v8i17/65166>.
- EMERENCIANO, M. G. C.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. In: MATOVIC, M. D. (Ed.). *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. Rijeka, Croatia: InTech, 2013a. p. 260 301–328.
- EMERENCIANO, M. G. C.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MIRANDA-BAEZA, A. Biofloc technology (BFT): A tool for water quality management in aquaculture. In: TUTU, H. (Ed.). *Water Quality*. InTech, 2017. p. 91–109.
- EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; ARÉVALO, M.; GAXIOLA, G. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: Spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquacultural Research*, v. 45, p. 1713–1726, 2014.
- EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; ARÉVALO, M.; MIQUELAJAUREGUI, M. M.; GAXIOLA, G. Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc condition. *Aquacultural International*, v. 21, p. 987–1007, 2013b. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9607-4>.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, p. 636–643, 2010.
- FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; DRUMOND, M. M.; ROSA, P. V. Effect of cryopreservant combinations on the

- motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 122, n. 3–4, p. 259–263, 2010.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 17, p. 1–13, 1990.
- FREGADOLLI, C. Seleção alimentar das larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 e tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 em laboratório. *Boletim Técnico CEPTA*, v. 6, p. 1–50, 1993.
- FRESNEDA, A.; VASQUEZ, J. C.; MONTOYA, L.; RAMIREZ, J. F. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 17, n. 4, p. 46–52, 2004.
- GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: A historical approach. *Reviews in Aquaculture*, p. 1–28, 2018.
- GALO, J. M.; STREIT-JUNIOR, D. P.; OLIVEIRA, C. A.; POVH, J. P.; FORNARI, D. C.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching, and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 79, p. 438–445, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.182391>.
- GODINHO, A. L.; LAMAS, I. R.; GODINHO, H. P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. *Environmental Biology of Fishes*, v. 87, p. 143–162, 2010.
- GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: Bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 3, p. 351–360, 2007.
- GODOY, M. P. *Peixes do Brasil, subordem Characoidei – Bacia do Rio Mogi Guassu*. Vol. 4. Piracicaba: Franciscana, 1975. 846 p.
- GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). *Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010. p. 589–606.

- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n. 1, p. 131–147, 1996.
- HAFEZ, E. S. E. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. p. 59–94.
- HARAZ, Y. G.; SHOURBELA, R. M.; EL-HAWARRY, W. N.; MANSOUR, A. M.; ELBLEHI, S. S. Performance of juvenile *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) raised in conventional and biofloc technology systems as influenced by probiotic water supplementation. *Aquaculture*, v. 566, 739180, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739180>.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa da Pecuária Municipal 2024. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- KHANJANI, M. H.; SHARIFINIA, M.; HAJIREZAE, S. Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. *Aquaculture*, 2022; 552:738021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738021>.
- KIM, D. Y.; SHINDE, S. K.; KADAM, A. A.; SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; KUMAR, M.; SYED, A.; BAHKALI, A. H.; GHODAKE, G. S. Advantage of species diversification to facilitate sustainable development of aquaculture sector. *Biology*, v. 11(3), p. 368, 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11030368>.
- KONZEN-FREITAS, A. R.; ABREU, J. G. de; ABREU, J. S. de; DANTAS, V. L. de Q.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; POVH, J. A. Tambaqui females (*Colossoma macropomum*) spawn after hormonal induction with buserelin acetate. *Animal Reproduction Science*, v. 221, 2020.
- KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 14, n. 82, p. 27-39, 2004.
- KUMAR, V. S.; PANDEY, P. K.; ANAND, T.; BHUVANESWARI, G. R.; DHINAKARAN, A.; KUMAR, S. Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive culture system. *J Environ Manage*, 215(1):206–215, 2018.
- KURADOMI, R. Y.; DE SOUZA, T. G.; FORESTI, F.; SCHULZ, R. W.; BOGERD, J.; MOREIRA, R. G.; FURLAN, L. R.; ALMEIDA, E. A.; MASCHIO, L. R.; BATALOUNI, S. R. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of

- pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. *Gen Comp Endocrinol*, 225(1):162–173, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.06.007>.
- LIMA, A. F.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G.; BARROSO, R. M. Reprodução, larvicultura e alevinagem de peixes. In: *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Brasília: Embrapa; p. 301–346, 2013.
- LIMA, J. J. F. Desenvolvimento e desempenho reprodutivo de lambaris (*Astyanax lacustris*) cultivados em sistema de bioflocos e em sistema de recirculação com água clara. [Dissertação de Mestrado]. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2022. Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira.
- LIMA, R. V. A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELLA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F.; SCHEMY, R. A.; BORELLA, M. I. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. *Bol Tec Cepta*, 4(1):1–46, 1991.
- LOIOLA, N. M. Indução hormonal da reprodução do surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) com diferentes hormônios. [Dissertação de Mestrado]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2010.
- MACHADO, S. S.; BLATT, T. L. S.; BUGLIONE NETO, C. C.; WATANABE, A. L.; NASCIMENTO, I. A.; GAGGINI, T. S. Hematology and zootechnical performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultured in bioflocs and aquaponics. *Braz J Dev*, 7(7):66555–66571, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-095>.
- MANSOUR, A. T.; ESTEBAN, M. Á. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol*, 64:202–209, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.025>.
- MARIA, A. N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). [Dissertação de Mestrado]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2005.
- MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus*

- mesopotamicus* – Holmberg, 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 1, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000100025>.
- MARQUES, N. R.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E. M.; FERNANDES, E. B. Seletividade alimentar de organismos-alimento por formas jovens de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). *Acta Scient Biolog Sci*, 29:167–176, 2007.
- MARTINS, E. D. F. F.; STREIT JR., D. P.; ABREU, J. S. de; CORRÊA-FILHO, R. A. C.; OLIVEIRA, C. A. L. de; et al. Ovopel and carp pituitary extract for the reproductive induction of *Colossoma macropomum* males. *Theriogenology*, v. 98, p. 57-61, 2017.
- MILIORINI, A. B., MURGAS, L. D. S., VIVEIROS, A. T. M., FRANCISCATTO, R. T., SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.26, n.3, 209-211, 2002.
- MORAIS, R. M.; SOUTO, C. N.; SILVA, L. A. S.; PÁDUA, D. M. C. Concentração espermática e fertilização artificial de ovócitos do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*). *Scientia Agraria Paranaensis – Sci. Agrar. Parana.*, v. 17(1), p. 144-148, 2018.
- MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, E. S.; VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.
- NAKAGHI, L. S. O.; MITSUIKI, D.; SANTOS, H. S. L.; PACHECO, M. R.; GANECO, L. N. Morphometry and morphology of nucleus of the Sertoli and interstitial cells of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1881) (Pisces: Characidae) during the reproductive cycle. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63, n. 1, p. 97-104, 2013.
- OLIVEIRA, F. C. E. Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada à crioprotetores: estudo de toxicidade. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.
- OLIVEIRA, R. L. Efeitos de hormônios sintéticos na desova, níveis plasmáticos de esteroides sexuais e expressão gênica de receptores hormonais em

- tambaqui (*Colossoma macropomum*). 2021. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2021.
- PAULINO, M. S.; MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; LIMA, F. S. M.; FELIZARDO, V. O. Reproductive performance of pacu, piracanjuba and curimba induced by busereline extract. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 37, p. 39-45, 2011.
- PEIXE, B. R. Anuário Peixe BR da Piscicultura de 2025. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2025>. Acesso em: 26 mar. 2025.
- PELLEGRIN, L.; NITZ, L. F.; PINTO, D. S. B.; COPATTI, C. E.; WASIELESKY, W.; GARCIA, L. Effects of suspended solids in the survival and haematological parameters of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) in a biofloc technology culture system. *Aquaculture Research*, p. 1-9, 2021. <https://doi.org/10.1111/are.15575>.
- PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. The use of mGnRHa provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. *Aquaculture International*, v. 25, p. 515-529, 2017.
- PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. *Animal Reproduction*, v. 15, p. 64, 2018.
- PEZZATO, A. C.; SILVEIRA, A. C.; FURLAN, L. R.; PEZZATO, L. E.; COSTA, C. Study on the nutrition value of pigeon pea meal (*Cajanus cajan* (L.) Millps) in broiler feed. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 30, n. 5, p. 569-576, 1995.
- PIRES, D. C.; BEZERRA, G. A.; WATANABE, A. L.; BUGLIONE NETO, C. C.; BICUDO, A. J. A.; HISANO, H. Optimal dietary protein level for pacu *Piaractus mesopotamicus* juveniles reared in biofloc system. *Aquaculture*, v. 556, p. 738274, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738274>.
- PIRES, L. B.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; SANCHES, E. A.; ROMAGOSA, E.; DA SILVA, T. G.; RECH, S.; STREIT JR, D. P.; POVH, J. A. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Animal Reproduction Science*, v. 196, p. 138-142, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.006>.
- PIRES, L. B.; SANCHES, E. A.; ROMAGOSA, E.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; STREIT JR, D. P.; NASS, R. A. R.; POVH, J. A. Semen characteristics of

- Colossoma macropomum* from three successive sample collections in the same reproductive cycle. *Aquaculture Research*, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.1111/are.13329>.
- POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JR, D. P.; MOREIRA, H. L. M.; SIEWERDT, F.; LOPERA-BARRERO, N. M.; MANGOLIN, C. A.; VARGAS, L. Microsatellite analysis of the parental contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the production of offspring in the semi-natural system of reproduction. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 2, p. 393-400, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000200018>.
- PURCHASE, C. F.; EARLE, P. T. Modifications to the ImageJ computer assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 28, p. 1013-1016, 2012.
- RAMÍREZ-NÚÑEZ, J.; CASTRO-MEJÍA, G; CASTRO-MEJÍA, J; OCAMPO-CERVANTES, J. A.; CASTRO-CASTELLÓN, A. E. Biofloc excess as raw material for flakes production to ornamental fish and their use as organic fertilizer (liquid or dry) for plants. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, v. 7, n. 6, p. 31–38, 2019.
- RAMOS, S. M.; RAMOS, R. O. Reprodução de peixes. Pirassununga: Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura, 1996. 20 p. (Apostila de curso).
- RESENDE, E. K.; PEREIRA, R. A. C.; ALMEIDA, V. L. L. Peixes herbívoros da planície inundável do Rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Embrapa CPAP*, 1998. Disponível em: <http://quati.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/BP10.pdf>. Acesso em: 10 set. 2025.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H. M. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. *Ciência e Cultura*, v. 40, n. 1, p. 60-64, 1988.
- ROZA DE ABREU, M.; SILVA, L. M. de J.; FIGUEIREDO-ARIKI, D. G.; SATO, R. T.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. The effect of LHRHa with and without dopamine antagonist on reproductive performance in lambari *Astyanax altiparanae*. *Aquaculture*, v. 550, 2022.

- ROZA DE ABREU, M.; SILVA, L. M. J.; FIGUEIREDO-ARIKI, D. G.; SATO, R. T.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. *Aquaculture Research*, v. 52, p. 471-483, 2021.
- 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.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; PINHEIRO, J. P. S.; ALMEIDA, P. S.; LOPES, J. T.; LEITE, L. V. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 8, n. 2, p. 343-350, 2014.
- SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SYKORA, R. M.; XAVIER, A. M. M. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis áspera*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 3, p. 357-362, 2011.
- SANTANA, G. M., 1998. Avaliação do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após 6, 18 e 24 horas de resfriamento à temperatura de 4°C. In: Congresso de Iniciação Científica da UFLA CICESAL, 9., Lavras. Abstracts.
- SANTOS, C. H. A.; MELO-JÚNIOR, A. P.; COSTA, H. J. M. S.; IGARASHI, M. A. Policultivo do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2006.
- SENTHILKUMARAN, B.; KAR, S. Advances in reproductive endocrinology and neuroendocrine research using catfish models. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 2807, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10112807>.
- SGNAULIN, T.; PINHO, S. M.; DURIGON, E. G.; et al. Culture of pacu *Piaractus mesopotamicus* in biofloc technology (BFT): insights on dietary protein sparing and stomach content. *Aquaculture International*, v. 29, p. 2319-2329, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00637-1>.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BRAGA, F. M. S. de S. Study on feeding habits of *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) larvae in fish ponds. *Naga ICLARM Q.*, v. 22, p. 24-30, 1999.

- SOUZA, A. R. S. de. Protocolo de criopreservação espermática de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando diferentes soluções crioprotetoras. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2022.
- SOUZA, B. E. de. Proteína bruta na alimentação de reprodutores do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, criados em tanque-rede. 2012. Tese (Doutorado em Aquicultura) — Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2012. Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Romagosa.
- SOUZA, F. N.; MARTINS, E. D. F. F.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; ABREU, J. S. de; PIRES, L. B.; STREIT JR., D. P.; et al. Ovopel and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Colossoma macropomum* females. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 53-57, 2018.
- SOUZA, T. G. D.; KURADOMI, R. Y.; RODRIGUES, S. M.; BATLOUNI, S. R. Wild *Leporinus friderici* induced spawning with different doses of mGnRH $\alpha$  and metoclopramide or carp pituitary extract. *Animal Reproduction*, v. 17, 2020.
- SPICA, L. N.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; EMERENCIANO, M. G. C.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; BRASILEIRO, L. O.; SOUSA, R. M.; STRINGHETTA, G. R.; GOMES, J. B. S.; da COSTA, A. A.; ROQUE, L. S.; PEDROSA, S. F.; POVH, J. A. Coletas sucessivas de sêmen de *Piaractus mesopotamicus* em tecnologia de bioflocos durante o período reprodutivo. *Animal Reprod Sci.*, v. e107821, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.107821>.
- SPICA, L. N.; SANCHES, E. A.; STREIT JUNIOR, D. P.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; BRASILEIRO, L. O.; RODRIGUES, R. B.; KASAI, R. Y. D.; POVH, J. A. Successive seminal collections from *Leiarius marmoratus* during the reproductive period. *Anim Reprod Sci.*, v. 234, p. 106852, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106852>.
- STREIT JR., D. P.; BENITES, C.; MORAES, G. V. de; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; CALDIERI, R. F. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 3, p. 289-297, jul./set. 2006b.
- STREIT JR., D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P. et al. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female

- pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum. Animal Science*, v. 27, n. 4, p. 439-447, 2005.
- STREIT JR., D. P.; OLIVEIRA, A. C. de; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V. de; GALO, J. M.; DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.
- STREIT JR., D. P.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V. de; MENDEZ, L. V.; GALLO, J. M.; DIGMAYER, M.; POVH, J. A. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. *Bioscienc. J.*, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 119-125, set./dez. 2006a.
- SUGANUMA, C. H. Avaliação da diversidade genética de populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. 2008. 130 p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.
- TEODOZIA, E. R. P.; ARAÚJO, M. S. O.; LOPES, J. T.; MONTENEGRO, A. R.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Criopreservação seminal de *Piaractus mesopotamicus*: efeito de diferentes diluentes e equipamentos de congelação. *Rev. Ciênc. Agron.*, v. 51, n. 2, e20196754, 2020. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039>.
- TONGDEE, T.; SIRIWUTTIWAT, N.; CHINPONGPUN, R.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P.; SANGVICHIE, E.; KANOKWAN, S. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional freezing: Effects on motility, morphology and DNA integrity. *Cryobiology*, v. 86, p. 1-7, 2019.
- VALANDRO, J. S. I. Desempenho reprodutivo do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) criados em diferentes sistemas fechados de produção. 2023. 138 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Botucatu. Orientador: Eduardo Antônio Sanches.
- VAN DOAN, H.; LUMSANGKUL, C.; HOSEINIFAR, S. H.; TONGSIRI, S.; CHITMANAT, C.; MUSTHAF, M. S.; EL-HAROON, E.; RINGO, E. Modulation of growth, innate immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture under biofloc system by supplementing pineapple peel

- powder and *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 115, p. 212-220, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.06.008>.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem.*, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.
- VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, v. 74, p. 551-556, 2010.
- VIVEIROS, A. T. M.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. *Neotrop Ichthyol.*, v. 12, n. 3, p. 643-648, 2014.
- WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, I. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília, DF: FAO, 1983.
- YOUSEFIAN, M.; MOUSAVI, S. E. The mechanism of reproduction and hormonal function in finfish species: a review. *Sci Res Essays*, 2011. <https://doi.org/10.5897/SRE10.015>.
- YU, Y. B.; CHOI, J. H.; LEE, J. H.; JO, A. H.; LEE, K. M.; KIM, J. H. Biofloc Technology in Fish Aquaculture: A Review. *Antioxidants*, v. 12, n. 2, p. 398, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12020398>.
- ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução e reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim.*, v. 31, p. 371-372, 2007.
- ZOHAR, Y.; MUNHOZ-CUETO, J. A.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.*, v. 165, n. 3, p. 438-455, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>.
- ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; TRUDEAU, V. L.; et al. A half century of fish gonadotropin-releasing hormones: Breaking paradigms. *J Neuroendocrinol.*, 2022. <https://doi.org/10.1111/jne.13069>.
- FAHY, G. M. Analysis of "solution effects" injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. *Biophysical Journal*, v. 32, p. 837-850, 1980.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60/61, p. 481-492, 2000.

GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica*, v. 40, p. 131-152, 1995.

WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertility and Sterility*, v. 83, p. 929-936, 2005.

CAPÍTULO II – Caracterização da qualidade seminal de peixes: movimento espermático, parâmetros físico-químicos e avaliação computadorizada (CASA)

## Caracterização da qualidade seminal de peixes: movimento espermático, parâmetros físico-químicos e avaliação computadorizada (CASA)

### **RESUMO**

A análise da qualidade seminal em peixes desempenha um papel crucial na aquicultura e na reprodução assistida, impactando diretamente as taxas de fertilização e o desenvolvimento embrionário. Métodos tradicionais de avaliação da motilidade espermática, apesar de amplamente utilizados, apresentam limitações devido à subjetividade e à variabilidade entre avaliadores. Com o avanço tecnológico, sistemas de Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA) surgiram como uma alternativa para fornecer resultados mais precisos e reprodutíveis. Esses sistemas quantificam parâmetros cinéticos, como motilidade, velocidade e retilinearidade, permitindo uma caracterização detalhada da qualidade seminal. Além disso, a análise de características morfológicas, integridade de membrana e atividade mitocondrial complementam a avaliação, auxiliando na seleção de reprodutores e na otimização de estratégias reprodutivas.

**Palavras-chave:** Análise seminal computadorizada assistida; Aquicultura; Motilidade espermática; Qualidade seminal; Reprodução de peixes

## Characterization of Fish Semen Quality: Sperm Motility, Physicochemical Parameters, and Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)

### **ABSTRACT**

Semen quality analysis in fish plays a crucial role in aquaculture and assisted reproduction, directly impacting fertilization rates and embryonic development. Traditional methods of evaluating sperm motility, although widely used, have limitations due to subjectivity and variability among evaluators. With technological advancements, Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) systems have emerged as an alternative to provide more precise and reproducible results. These systems quantify kinetic parameters such as motility, velocity, and straightness, enabling a detailed characterization of semen quality. Additionally, the analysis of morphological characteristics, membrane integrity, and mitochondrial activity complement the evaluation, supporting breeder selection and optimizing reproductive strategies.

**Keywords:** Aquaculture; Computer-assisted sperm analysis; Fish reproduction; Semen quality; Spermatozoa motility

## 1. Introdução

A análise da qualidade seminal de peixes é uma ferramenta essencial para a aquicultura e a reprodução assistida, permitindo otimizar o uso de reprodutores e aumentar a eficiência dos processos de fertilização. O sêmen de alta qualidade está diretamente associado ao sucesso reprodutivo, influenciando tanto a taxa de fertilização quanto o desenvolvimento embrionário (RURANGWA et al., 2004; GALLEGO E ASTURIANO, 2018). Assim, métodos precisos e reprodutíveis para avaliar a qualidade seminal são cruciais para a maximização da produção de alevinos em sistemas de reprodução controlada.

Tradicionalmente, a avaliação da motilidade espermática de peixes é realizada de maneira subjetiva, onde uma gota de sêmen era misturada a uma gota de água destilada em uma lâmina, e o avaliador observava o vigor e a mobilidade dos espermatozoides a olho nu, com o auxílio de um cronômetro (FAUVEL, SUQUET E COSSON, 2010). Esse método, apesar de amplamente utilizado, possui limitações significativas, uma vez que a experiência do avaliador influencia diretamente nos resultados obtidos (GALLEGO et al., 2018). Além disso, a variabilidade entre diferentes avaliadores compromete a padronização e a comparação de dados, tornando a técnica suscetível a erros e dificultando a obtenção de resultados consistentes (VIVEIROS et al., 2010).

Com o avanço das tecnologias, métodos de análise computadorizada assistida (CASA) emergiram como alternativa para reduzir a subjetividade das análises e proporcionar maior precisão. O sistema CASA permite quantificar com mais objetividade o movimento espermático, fornecendo parâmetros detalhados e reprodutíveis, facilitando comparações entre amostras e estudos. Além do movimento espermático, a avaliação da qualidade seminal envolve a análise de características quantitativas, como volume e concentração espermática, que são essenciais para determinar a quantidade de espermatozoides necessária para uma fertilização eficiente. Essas variáveis variam entre espécies e indivíduos, sendo fundamentais para o planejamento de estratégias reprodutivas e o uso racional do sêmen de reprodutores geneticamente valiosos.

Portanto, a caracterização detalhada da qualidade seminal, integrando análises tradicionais e computadorizadas, permite uma compreensão mais ampla dos fatores que influenciam o sucesso reprodutivo em peixes. Esse

conhecimento é indispensável para o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida e a maximização da produção em ambientes controlados, promovendo a sustentabilidade da piscicultura.

## 2. Morfologia e movimento espermático

A movimentação espermática é um processo biológico essencial que permite aos espermatozoides alcançarem e fertilizarem o ovócito. Estruturalmente, a célula espermática é composta por três regiões principais: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 1). A cabeça carrega a carga genética em forma de cromatina estabilizada, enquanto a peça intermediária e o flagelo constituem o sistema propulsor. A peça intermediária é rica em mitocôndrias, que produzem energia em forma de ATP, essencial para a propagação de ondas ao longo do flagelo. Este, por sua vez, é composto por microtúbulos organizados em um padrão de "9+2", nos quais a dineína, uma ATPase, desempenha um papel crítico na geração de movimento (MORTIMER et al., 1997).

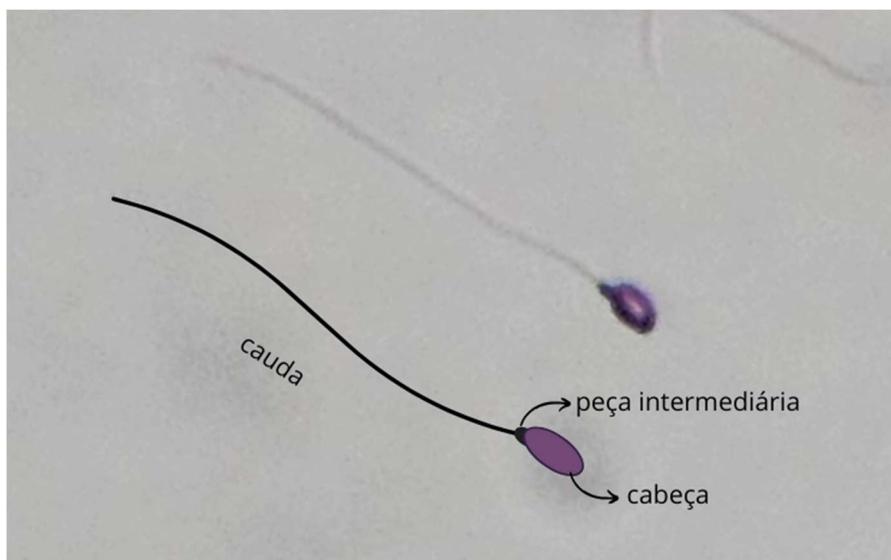


Figura 1. Esquema ilustrativo evidenciando as três regiões principais da morfologia de um espermatozoide de *Piaractus mesopotamicus* (Fonte: Autoria própria).

O movimento do flagelo é iniciado na peça intermediária e propagado de forma helicoidal ao longo da cauda. O ciclo de interação entre os braços de

dineína e os microtúbulos circunferenciais resulta em uma onda que é traduzida em movimento propulsivo. O padrão dessa propagação determina a amplitude das ondas flagelares, influenciando diretamente o comportamento da cabeça espermática. Quando as ondas possuem baixa amplitude próximo à cabeça, o movimento lateral dela é reduzido, favorecendo o deslocamento progressivo. Em contrapartida, ondas de alta amplitude resultam em movimentos laterais mais acentuados, comprometendo a progressão linear.

Estudos demonstram que o plasma seminal reduz a velocidade progressiva e o movimento lateral da cabeça em comparação aos espermatozoides incubados em condições de capacitação, que apresentam padrões de movimento mais favoráveis à fertilização (SERRES et al., 1984). Essa observação é relevante não apenas para entender a dinâmica reprodutiva, mas também para a otimização de técnicas de reprodução assistida.

Do ponto de vista técnico, a análise da movimentação espermática é realizada predominantemente com base no comportamento da cabeça. Isso ocorre porque o movimento flagelar é extremamente rápido, podendo atingir até 80 batimentos por segundo, tornando difícil o registro preciso com tecnologia de vídeo convencional (MORTIMER et al., 1997). Em contraste, a cabeça apresenta deslocamento mais lento, permitindo uma análise mais detalhada. Como o padrão de movimento da cabeça é diretamente influenciado pelo batimento flagelar, ele serve como um indicador indireto da dinâmica do flagelo.

Assim, a compreensão detalhada da movimentação espermática é essencial para avançar nosso conhecimento sobre fertilização e reprodução assistida. Além disso, a investigação sobre as interações entre estrutura, funcionalidade e ambiente externo pode oferecer *insights* valiosos para o desenvolvimento de novas estratégias em biotecnologia reprodutiva.

### **3. Características quantitativas e qualitativas do sêmen**

Geralmente, as espermatogônias entram em meiose após um número fixo de divisões mitóticas (COURROT, REVIERS e ORTAVANT, 1970). Enquanto, em mamíferos o número de divisões mitóticas das espermatogônias é cinco (camundongos e ratos) ou seis (vacas e ovelhas; CLERMONT, 1972), em peixes essas divisões são mais numerosas (dez em *Anguilla japonica* – MIURA et al.,

1991; nove ou dez em *Oryzias latipes* – SHIBATA E HAMAGUCHI, 1988; 14 em *Poecilia reticulata* – BILLARD, 1986; cinco a seis em *Danio rerio* – EWING, 1972). Devido ao grande número de divisões mitóticas das espermatogônias, a produção espermática dos peixes teleósteos é muito alta quando comparada à de mamíferos (BILLARD, 1990a), apresentando uma grande variação entre as espécies. Em algumas espécies, o macho chega a produzir 100 bilhões de espermatozoides/ano/kg de peso corporal ou mais de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/g de testículo/dia (BILLARD, 1990b). Em peixes teleósteos, os espermatozoides permanecem quiescentes na osmolaridade do plasma seminal (condição isotônica de aproximadamente 300 mOsmol/kg). Em peixes de água doce, a quiescência é mantida até que os espermatozoides entrem em contato com uma solução hipotônica, ou seja, osmolaridade inferior a 300 mOsmol/kg (COSSON, 2004).

A descrição de características para cada espécie é de grande importância para o desenvolvimento de programas de reprodução artificial (VIVEIROS e GODINHO, 2009). São comumente analisadas as características físicas e químicas do sêmen, tais como volume, cinética espermática, concentração, integridade de membrana, morfologia, atividade mitocondrial e pH. O conhecimento desses parâmetros permite avaliar a qualidade do sêmen coletado e, assim, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (MURGAS et al., 2011).

Os espermatozoides permanecem imóveis quando nos testículos dos peixes, apenas entrando em atividade após contato com solução hiposmótica em relação ao plasma seminal (COSSON, 2010). Dentre as características mensuradas previamente a essa ativação é interessante citar os indicadores quantitativos de volume seminal, concentração espermática e produção total de espermatozoides, e os indicadores qualitativos de integridade de membrana e normalidade dos espermatozoides.

O volume seminal é uma característica muito variável entre as diversas espécies e até mesmo na mesma espécie, uma vez que pode ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de coleta (MURGAS et al., 2011). O volume também pode variar devido à presença de tratamento hormonal, quando é observado um aumento significativo no volume seminal (VIVEIROS e GODINHO, 2009; VIEIRA et al., 2011). A quantidade de

sêmen (volume e número de espermatozoides) produzido por peixes varia de acordo com a espécie, o indivíduo e o método de coleta, entre outras variáveis. O tratamento hormonal aplicado algumas horas antes da coleta é comumente utilizado para aumentar o volume de sêmen coletado. Esse tratamento facilita a coleta porque induz a hidratação testicular, causando o aumento do volume de sêmen, porém, paralelamente, ocorre redução da concentração espermática (BILLARD et al., 1987; VIVEIROS et al., 2002).

O pH extracelular do sêmen de peixes (peixes de água doce pH 6,5 a 8,5) é um fator que controla os parâmetros da motilidade, e seus valores ótimos são necessários, embora não suficientes, para as condições de ativação espermática. Dessa forma, alterações do pH seminal de peixes atuam como possível mensageiro celular secundário capaz de interferir na motilidade espermática de diferentes espécies (TABARES, TARAZONA E OLIVEIRA, 2005).

Segundo Sanches et al. (2011) a concentração espermática, assim como a produção total de espermatozoides de um animal maduro, está relacionada com a capacidade reprodutiva desse. A concentração espermática expressa a quantidade de espermatozoides por mililitro de sêmen (FELIZARDO et al., 2010). O método básico para determinar esse parâmetro é a contagem das células em câmaras volumétricas. Trata-se de um método barato, realizado utilizando apenas um microscópio óptico e uma câmara volumétrica, como a Câmara de Neubauer (Figura 2) (FAUVEL, SUQUET e COSSON, 2010). Essa é uma avaliação importante para adotar protocolos adequados de reprodução artificial, permitindo ao produtor mensurar adequadamente a dose inseminante a ser aplicada, assim como a seleção de quais machos são apropriados para o manejo reprodutivo, aumentando assim as taxas de fertilização no final do processo.

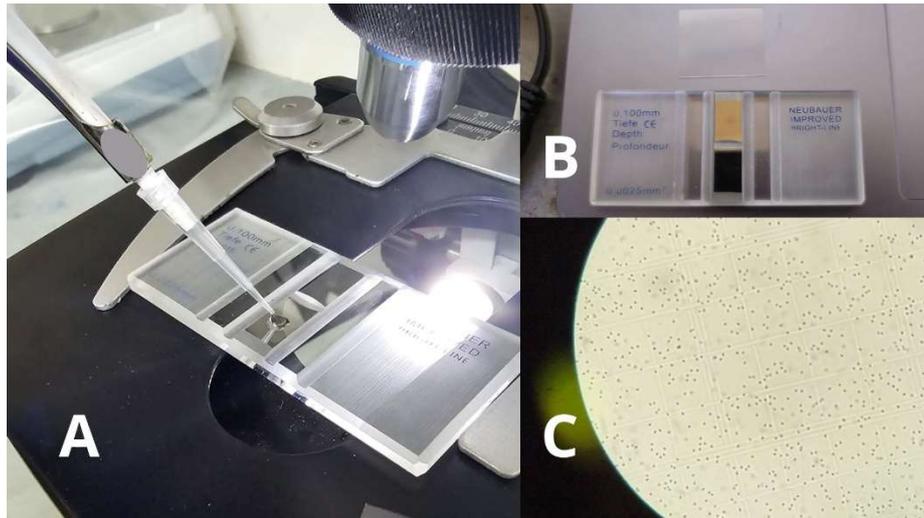


Figura 2. Observação de espermatozoides em microscopia utilizando uma câmara hematimétrica de Neubauer. A: Deposição de amostra de sêmen em um dos campos (campo inferior); B: Câmara hematimétrica de Neubauer e lamínula de vidro; C: Observação de células espermáticas sobre os quadrantes marcados pelas linhas perpendiculares (Fonte: Autoria própria).

A integridade de membrana está diretamente relacionada com a capacidade de locomoção dos espermatozoides e, conseqüentemente, com a probabilidade de esses encontrarem e fertilizarem os oócitos. Lesões na membrana plasmática (Figura 3) levam à perda da sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático (AITKEN E KRAUSZ, 2001).

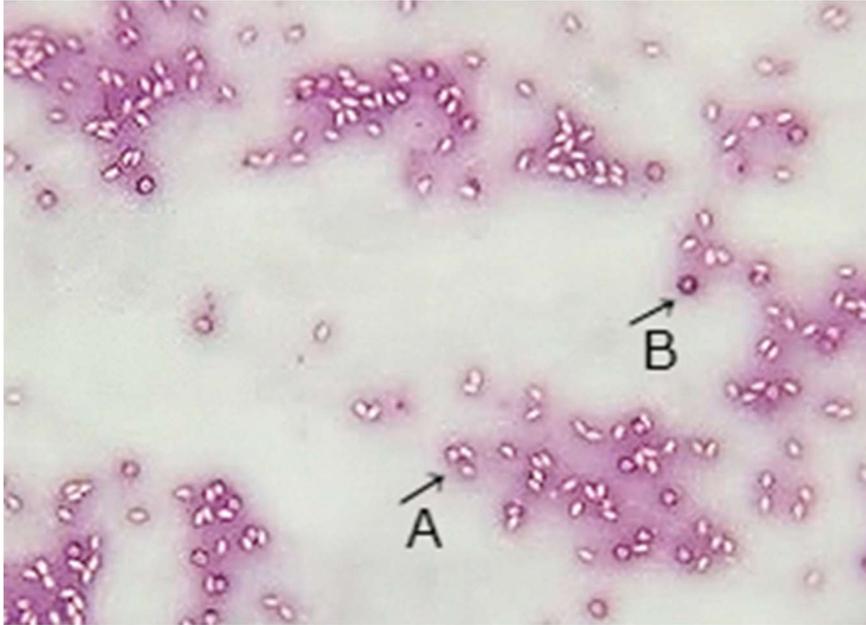


Figura 3. Espermatozoides em lâmina montada para avaliação de taxa de integridade de membrana. A: célula branca, indicando membrana íntegra; B: célula rosada, indicando membrana danificada (corante: eosina-nigrosina; aumento final: 400x; Fonte: Autoria própria).

A morfologia das células espermáticas (Figura 4) é um fator importante na avaliação da qualidade do sêmen, uma vez que o aumento das patologias espermáticas pode causar redução da motilidade e do vigor espermático (COSSON et al., 1999). Dessa forma, a avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante ou de amostras congeladas de sêmen, explicando, insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (MILIORINI, 2006).

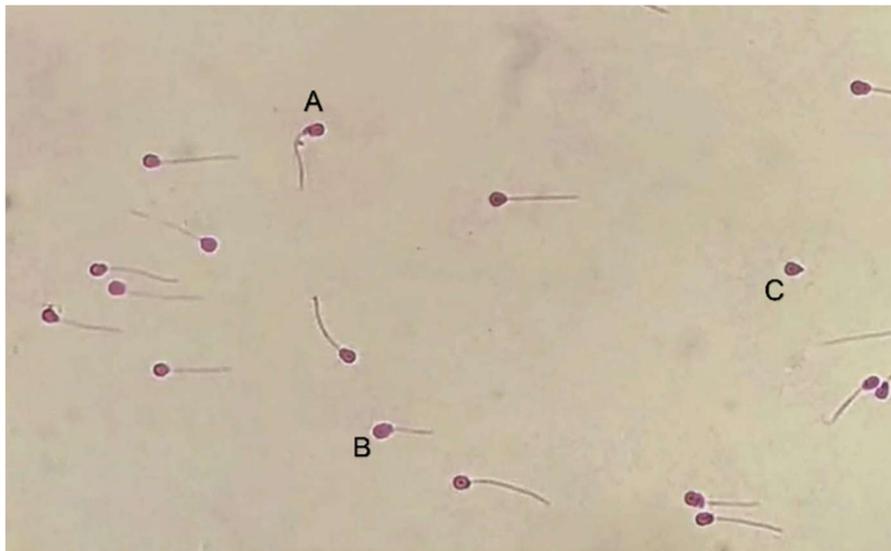


Figura 4. Espermatozoides em lâmina montada para avaliação de taxa de normalidade. A: espermatozoide com gota na região proximal da cauda; B: espermatozoide com cauda curta; C: cabeça solta (corante: rosa de bengala; aumento final: 400x; Fonte: Autoria própria).

A análise da atividade mitocondrial de células espermáticas é crucial para avaliar a qualidade do esperma em peixes. As mitocôndrias presentes na peça intermediária são responsáveis pela produção de energia (ATP) através da fosforilação oxidativa, essencial para a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (BARTHE OKO, 1989; GRAVANCE et al., 2000). É geralmente realizada utilizando técnicas de fluorescência, como a coloração com sondas fluorescentes específicas que se acumulam nas mitocôndrias ativas. A intensidade da fluorescência é então medida por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência, permitindo a avaliação quantitativa da atividade mitocondrial (GARNER et al., 1999; CELEGHINI et al., 2005).

A quantidade de mitocôndrias nos espermatozoides de peixes varia entre as espécies, oscilando entre 2 e 9 por célula, e apresenta uma relação direta com a duração da motilidade (YAO et al., 1999). Entretanto, LINHART et al. (2006) destacam que a motilidade espermática pode ser mais influenciada pela disponibilidade de ATP do que pelo número de mitocôndrias. Segundo esses autores, a ativação da motilidade leva a um consumo energético extremamente rápido, e as mitocôndrias não conseguem reabastecer essa demanda de forma imediata, tornando essencial a quantidade de ATP armazenada no flagelo antes

da ativação. Independentemente, observa-se uma correlação positiva entre o número de mitocôndrias, os níveis de ATP e a motilidade espermática (ALAVI et al., 2013).

Fatores como estresse ambiental, nutrição inadequada, idade avançada dos reprodutores ou problemas genéticos podem contribuir para a redução da atividade mitocondrial. Enquanto valores acima da média são indicadores de uma alta eficiência na produção de energia pelas mitocôndrias, resultando em espermatozoides com maior motilidade e potencial fertilizante, valores extremamente altos também podem ser indicativos de estresse oxidativo, que pode danificar a estrutura celular e diminuir a qualidade espermática a longo prazo (AMANN E KATZ, 2004).

#### **4. *Computer assisted semen analysis – CASA***

O aplicativo CASA-Mot foi desenvolvido por Wilson-Leedy & Ingermann (2007), sendo uma técnica que avalia de forma objetiva a motilidade seminal de peixes permite que qualquer laboratório de piscicultura tenha acesso a resultados seguros, padronizados e, conseqüentemente, replicáveis (PURCHASE E EARLE, 2012).

Este aplicativo é desenvolvido para um software livre (ImageJ; National Institutes of Health, USA) e, além de ser acessível ao usuário, é de fácil manipulação. Qualquer pessoa, com um treinamento básico para operar o software, é capaz de alcançar resultados fidedignos. Para obtenção de resultados precisos, é necessário que o operador do sistema possua conhecimento sobre os recursos disponibilizados pelo ImageJ, domine os 18 parâmetros de avaliação mais adequados para a espécie, que devem ser inseridos no aplicativo CASA-Mot (Figura 5), e prepare previamente as imagens de maneira adequada (NEUMANN et al., 2013).

O CASA identifica cada espermatozoide e a partir da trajetória construída em um plano cartesiano  $xy$  na sequência de imagens inseridas é capaz de calcular os parâmetros que descrevem o movimento das células (AMANN E WABERSKI, 2014; FAUVEL, SUQUET E COSSON, 2010; RURANGWA et al., 2004). Esses parâmetros são motilidade espermática (MOT), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL),

frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB).

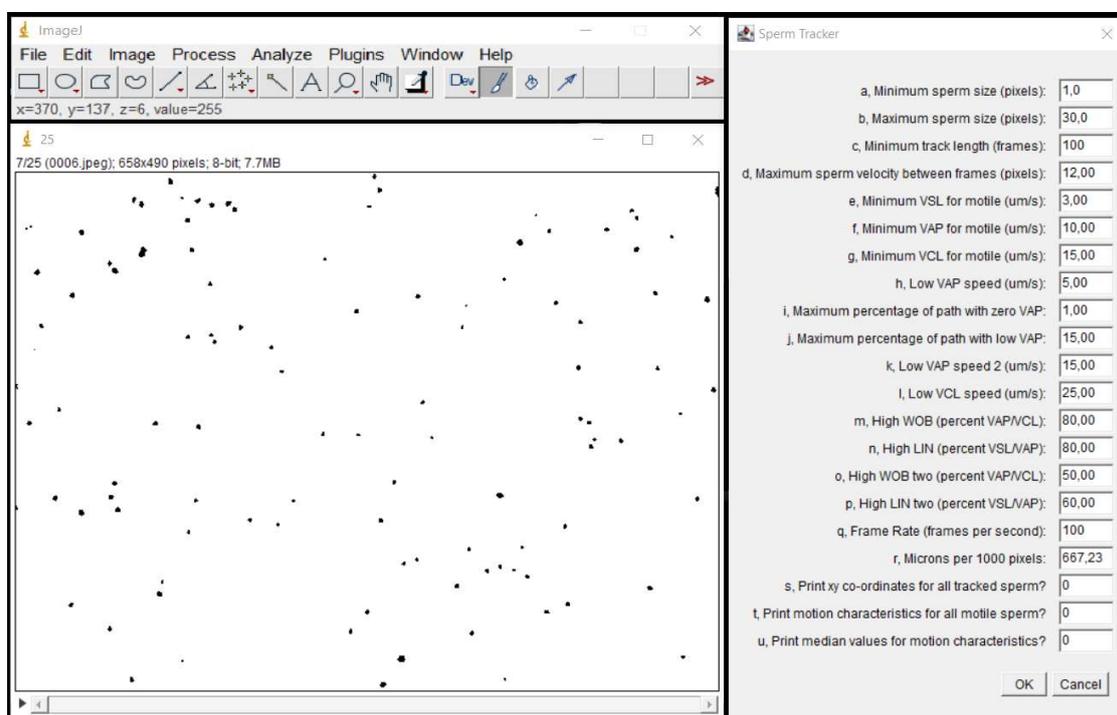


Figura 5. Captura de tela ilustrando as imagens devidamente tratadas importadas no *software* ImageJ juntamente com os 18 parâmetros adequados para avaliação do sêmen inseridos no aplicativo CASA (Fonte: Autoria própria).

Outro método utilizado em análises objetivas da motilidade é o conjunto de hardware e software Sperm Class Analyser (CASA-SCA<sup>®</sup>) que também visualiza, digitaliza e analisa imagens sucessivas, gerando informações precisas e significativas do movimento individual de cada célula e de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004; Figura 6).

Esse sistema é composto por um microscópio óptico trinocular que grava o movimento em sequência quadro a quadro, através de uma câmera filmadora acoplada. Enquanto marca em um determinado tempo a posição de cada espermatozoide, o sistema calcula as velocidades e a motilidade (KIME et al., 2001). Os parâmetros informados são os mesmos gerados pelo CASA-ImageJ (MOT, VCL, VSL, VAP, STR e BCF) com exceção da progressão (PROG) e inclusão da linearidade (LIN) e deslocamento lateral da cabeça (ALH; MEDINA, 2008).

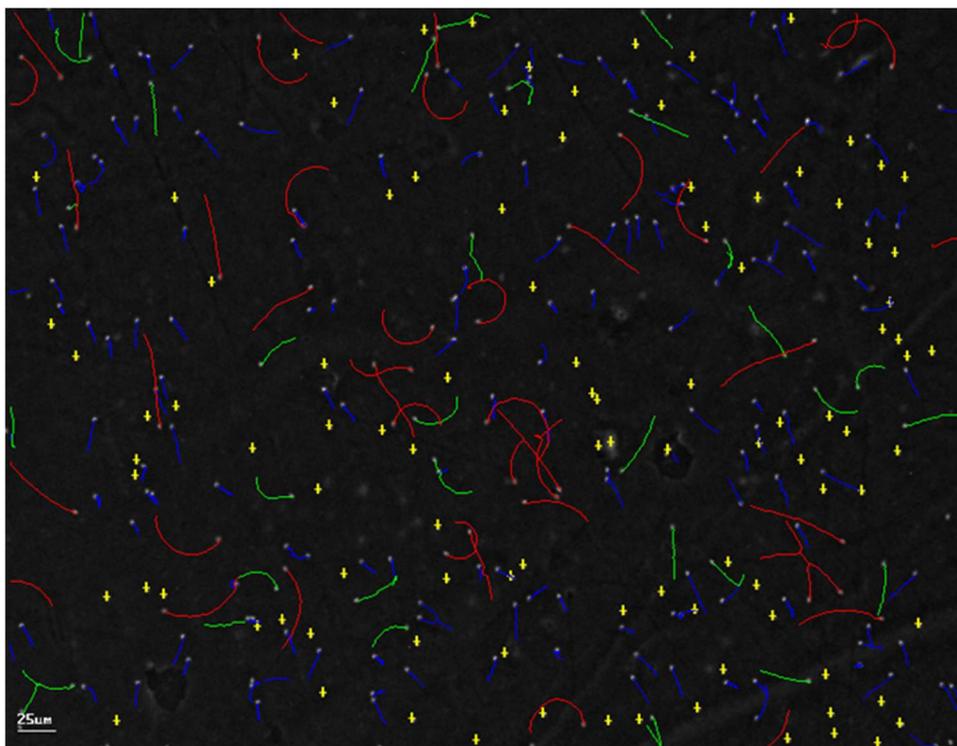


Figura 6. Imagem gerada pelo software CASA-SCA<sup>®</sup> evidenciando a trajetória dos espermatozoides classificados como rápidos (vermelho), com velocidade média (verde), lentos (azul) e imóveis (amarelo; Fonte: Autoria própria).

A vantagem da utilização do software CASA-SCA<sup>®</sup> em relação ao CASA-ImageJ está no processo de avaliação. Para mensuração de características cinéticas do sêmen utilizando o *software* CASA-ImageJ, como já mencionado anteriormente, é necessário que o avaliador (i) grave a movimentação dos espermatozoides com auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio, (ii) salve o arquivo em diretório específico, (iii) faça o upload desse arquivo em um software de edição de vídeos para ajuste de brilho, contraste, adição de filtros de imagem e recortes de sequências de imagens, (iv) faça o upload dessas sequências de imagem no *software* ImageJ, com o plugin CASA instalado, (v) deve performar a análise adicionando os parâmetros de avaliação adequados para a espécie em questão e (vi) deve salvar os resultados na planilha de dados. Já para mensuração de características cinéticas do sêmen utilizando o CASA-SCA<sup>®</sup>, basta que o avaliador (i) configure o software com os parâmetros de avaliação adequados e (ii) grave a movimentação dos espermatozoides,

enquanto o processo de edição de imagem, avaliação e tabulação é feita automaticamente por esse software.

Embora o *software* CASA-ImageJ possua maior complexidade de operação, este é livre (gratuito) e flexível, permitindo seu uso em diferentes locais, como pisciculturas, laboratórios ou outros ambientes de coleta de dados. O CASA-SCA® apresenta limitações nesse aspecto. Além de exigir uma assinatura paga, seu hardware e software são integrados e fixos, o que reduz significativamente a possibilidade de transporte do equipamento para outros locais de análise.

#### 4.1. Descrição de variáveis cinéticas

Taxa de motilidade espermática (MOT, %) refere-se à relação percentual entre espermatozoides considerados móveis e o total de espermatozoides no campo de visualização. Para obtenção de valores MOT adequados, o programa deve ser configurado com os parâmetros apropriados da espécie em questão e irá considerar como móveis todos os espermatozoides reconhecidos dentro do campo de visão que possuem velocidades média de deslocamento, velocidade curvilínea e velocidade em linha reta acima daquelas definidas pelo avaliador. Esse valor de velocidade mínima é definido através de uma avaliação prévia do comportamento dos espermatozoides através do isolamento e classificação das células espermáticas em imóveis, lentas não progressivas, lentas progressivas, médias e rápidas (Figura 7).

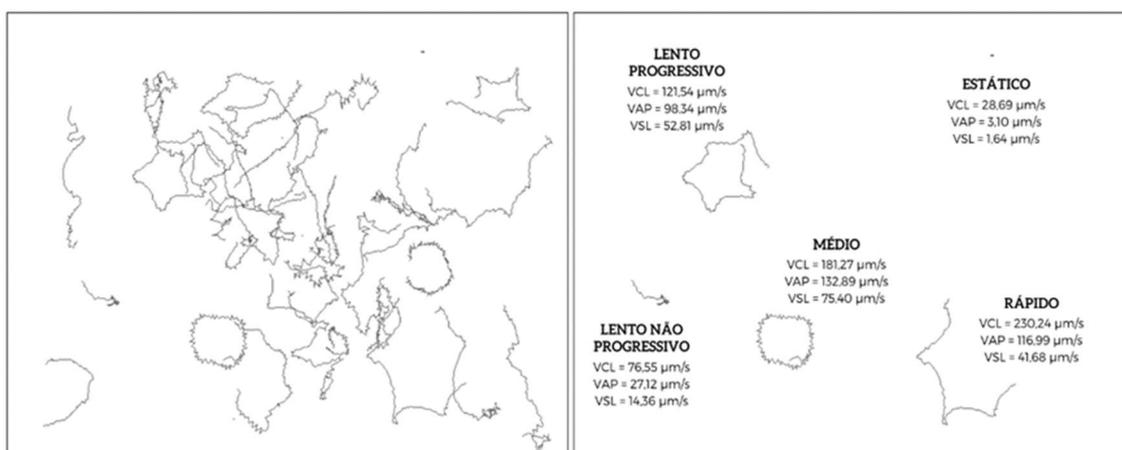


Figura 7. Imagem ilustrativa das trajetórias isoladas de cinco espermatozoides de *P. mesopotamicus* e sua classificação de acordo com seus respectivos valores para VCL, VAP e VSL (Fonte: Autoria própria).

Após a reconstrução digital da trajetória de cada espermatozoide, através do reconhecimento da célula e rastreamento da sua movimentação *frame-to-frame*, o software tem informações suficientes para calcular as diferentes variáveis que descrevem o padrão da sua movimentação. Esse padrão varia de espécie para espécie e pode ser reconhecido através dos valores médios encontrados para VCL, VAP, VSL, STR, LIN e WOB.

A velocidade média de deslocamento (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ) é calculada pela suavização da trajetória curvilínea de acordo com os algoritmos do CASA, levando em consideração o caminho construído ponto a ponto. O número de pontos dessa suavização varia de acordo com a taxa de quadros usado para captura dos vídeos na proporção de 1:6 (pontos:fps). Em casos em que a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL (Figuras 8 e 9).

A velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) é a velocidade da célula ao longo da trajetória real, e o valor é sempre o maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade e oscilação. A velocidade em linha reta (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ) refere-se à velocidade calculada levando em consideração o deslocamento representado pela linha reta entre o ponto inicial e ponto final da trajetória, e é sempre a menor das três velocidades.

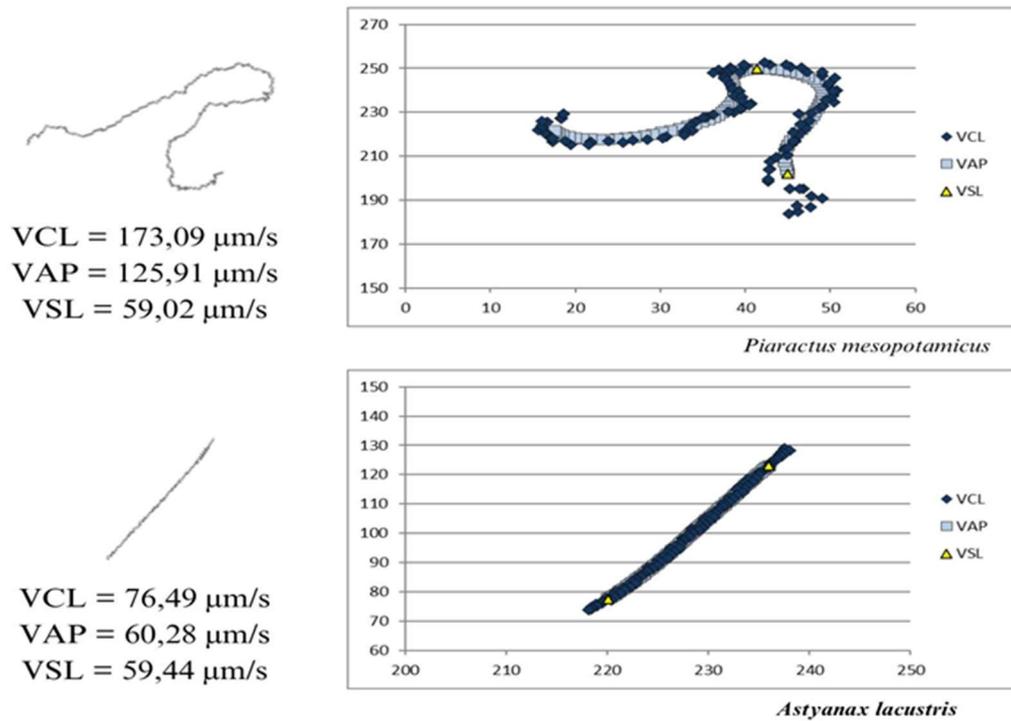


Figura 8. Transcrição da trajetória de uma célula espermática de *Piaractus mesopotamicus* e *Astyanax lacustris* em plano cartesiano (xy) evidenciando as diferentes trajetórias e os pontos levados em consideração para o cálculo de VCL, VAP e VSL em cada caso (Fonte: Autoria própria).

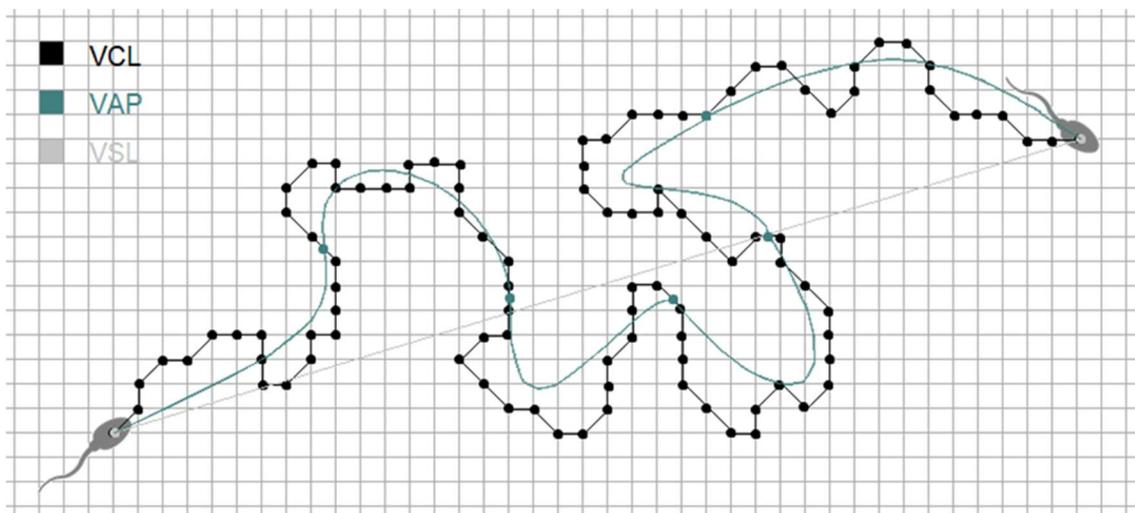


Figura 9. Esquema ilustrativo da trajetória de um espermatozoide e os diferentes deslocamentos levados em consideração para os cálculos das suas diferentes velocidades (taxa de captura = 100 fps; Fonte: Autoria própria).

A retilinearidade (STR, %) representa a relação percentual resultante da divisão VSL/VAP (linearidade do deslocamento médio). A oscilação (WOB, %) mensura a oscilação entre a trajetória real e a trajetória média, calculada a partir da relação percentual da divisão VAP/VCL e a linearidade (LIN; %) a relação percentual resultante da divisão VSL/VCL (linearidade do deslocamento curvilinear). Estas variáveis trazem informações pertinentes ao padrão de movimentação das células espermáticas (Figura 10).

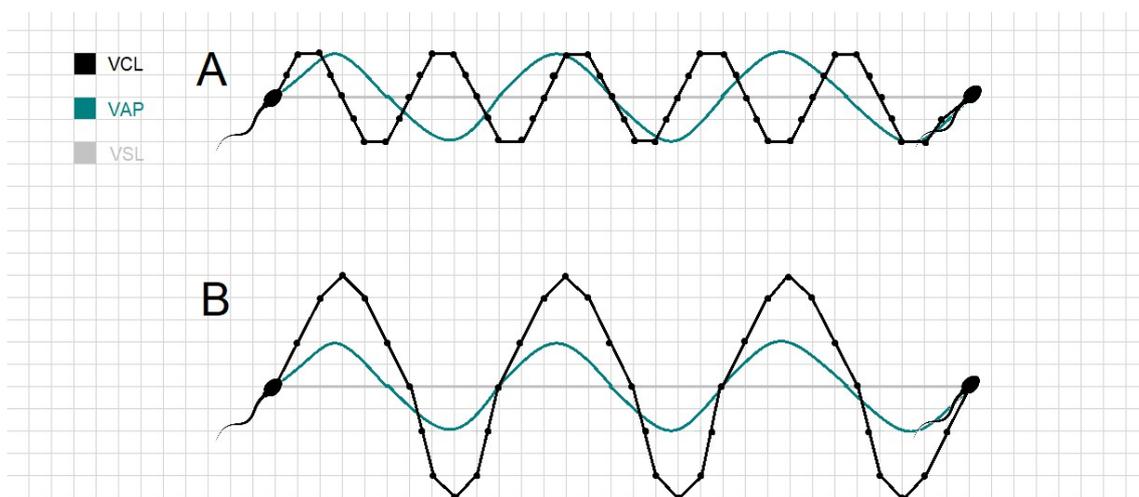


Figura 10. Esquema ilustrativo da trajetória de espermatozoides com valores semelhantes de VAP e diferentes valores de VCL. Valor da trajetória total de A= 54,7  $\mu\text{m}$ ; Valor da trajetória total de B= 65,7  $\mu\text{m}$  (taxa de captura = 100 fps; Fonte: Autoria própria).

Ao verificar espermatozoides que possuem o mesmo movimento ao longo da trajetória média (trajetória da VAP), porém com diferentes valores de deslocamento total (trajetória da VCL), percebe-se que aquele com maior deslocamento (Figura 14.B) apresenta maiores valores de oscilação e menores valores de linearidade.

A frequência de batimento transposto (BCF, Hz), é o número de vezes em que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento (VCL/VAP) e o deslocamento lateral da cabeça (ALH;  $\mu\text{m}$ ), é a magnitude desses cruzamentos. Estas variáveis trazem informações quanto à movimentação da cabeça do espermatozoide e gasto energético.

Células espermáticas que apresentam valores altos de BCF e ALH tendem a se deslocar menos com maior gasto energético, enquanto células com valores de BCF baixos, indicam que a célula cobriu seu deslocamento máximo com baixa frequência de movimentação de cabeça e ALH próximo a zero, indicando que seu gasto energético foi eficiente, possibilitando deslocamentos maiores, aumentando as chances de os espermatozoides encontrarem a micrópila dos ovócitos e efetuar a fertilização. Células espermáticas de *Leiarius marmoratus* possuem valores médios para BCF e ALH, enquanto células de *Piaractus mesopotamicus* apresentam valores baixos de BCF e ALH e espermatozoides de *Oreochromis niloticus* são células com valores altos de BCF e ALH (Figura 11).

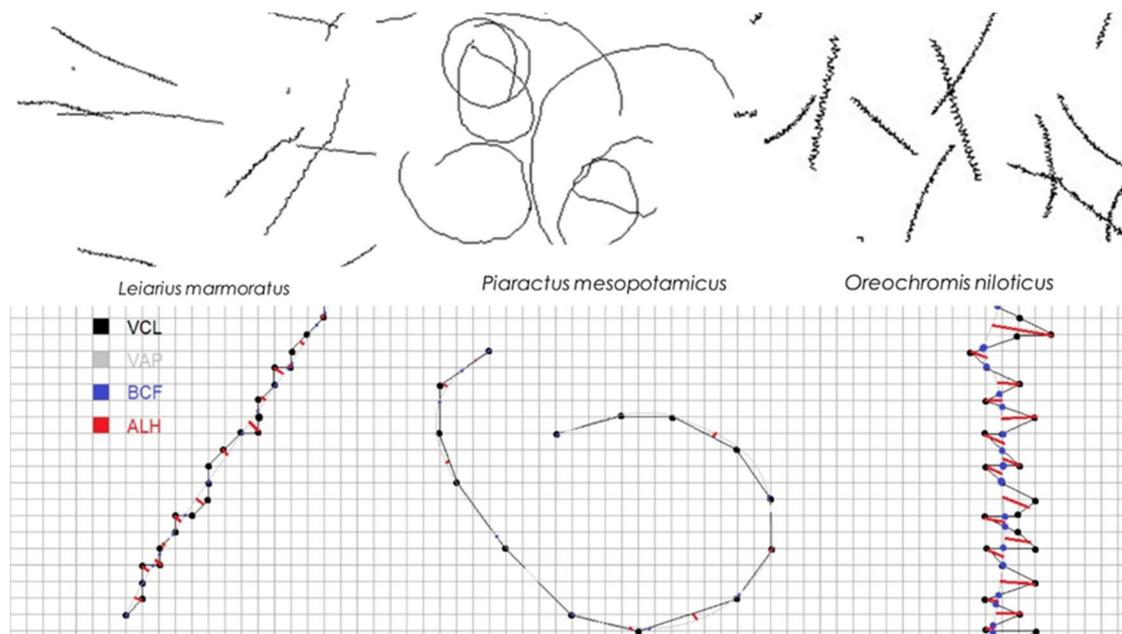


Figura 11. Esquema ilustrativo evidenciando a diferença entre valores de BCF e ALH entre espécies com diferentes padrões de movimentação (Fonte: Autoria própria).

Progressão (PROG;  $\mu\text{m}$ ) é a distância média do espermatozoide de sua origem no deslocamento médio durante todos os quadros analisados. A divisão desta variável por VAP, produz uma descrição da eficiência média em termos da porção de movimento generalizado que resulta em movimento para longe da origem. Uma trajetória perfeitamente circular terá uma eficiência maior do que um caminho errático com a mesma linearidade (VERSTEGEN et al., 2002).

#### 4.2. Taxa de frames por segundo (fps)

A taxa de *frames* por segundo (fps) é uma unidade de medida que representa a quantidade de quadros compilados em uma sequência de imagens ou vídeo dentro do período de um segundo. O valor da taxa de frames por segundo da câmera utilizada para a captura das imagens que serão utilizadas na avaliação das características cinéticas do sêmen dos peixes é crucial para garantir a precisão da avaliação. É necessário um FPS elevado (normalmente de 50 a 200 fps) para capturar os movimentos dos espermatozoides com parâmetros de velocidade mais elevados. Taxas de quadros reduzidas podem comprometer aspectos cruciais do percurso espermático, subestimando ou alterando os parâmetros cinéticos. Variáveis como progressão, a velocidade curvilinear, velocidade média de deslocamento e, conseqüentemente, STR, LIN e WOB vão ser afetadas significativamente de acordo com a taxa de fps aplicada no momento de captura dos vídeos (Figura 12).

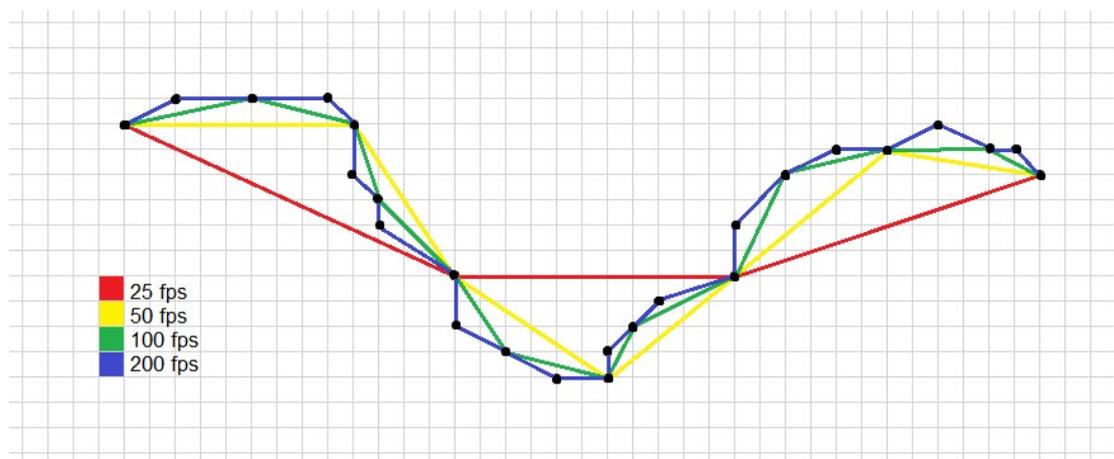


Figura 12. Imagem ilustrativa da variação do trajeto de um espermatozoide de acordo com a taxa de frames utilizada para captura do vídeo. Trajetória em vermelho (25 fps): PROG = 37,9 unidades; amarelo: PROG = 43,7 unidades; verde: PROG = 45,9 unidades; azul: PROG = 48,6 unidades (trajetória mais próxima da real; Fonte: Autoria própria).

Em peixes, onde os espermatozoides são extremamente móveis e possuem um período de motilidade breve, um FPS elevado (superior a 100 fps) é crucial para registrar os primeiros movimentos com maior exatidão. Porém, o número de FPS vai afetar mais a precisão de análise de sêmen daquelas espécies que possuem células espermáticas com movimentação rápida e

circular comparativamente a espécies que possuem movimentação letárgica e em linha reta.

Valores de FPS muito elevados podem elevar o preço dos aparelhos e o volume de dados produzidos, demandando uma capacidade de processamento mais robusta. A seleção do FPS ideal deve harmonizar precisão e viabilidade técnica, levando em conta a espécie de peixe a ser analisada e as metas da pesquisa. Na análise CASA, a configuração adequada do FPS é um elemento técnico crucial que impacta diretamente a replicabilidade e a confiabilidade dos resultados.

## **5. Conclusão**

A avaliação da qualidade seminal em peixes é um componente essencial para o sucesso da reprodução assistida e para a eficiência na produção aquícola. Métodos tradicionais, embora ainda utilizados, demonstram limitações que comprometem a padronização dos resultados. A introdução de tecnologias como o sistema CASA trouxe maior objetividade e precisão à análise, permitindo uma caracterização mais detalhada da motilidade espermática e de outros parâmetros relevantes. A integração de métodos tradicionais e modernos proporciona uma compreensão mais abrangente da qualidade seminal, possibilitando o aprimoramento contínuo das estratégias de manejo reprodutivo e contribuindo para a sustentabilidade da piscicultura.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT); e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

### Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### Declaração de contribuição de autoria CRediT

**Louise Nex Spica:** Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Administração do projeto, Visualização, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. **Jayme Aparecido Povh:** Conceitualização, Investigação, Administração do projeto, Supervisão, Validação, Visualização, Redação – revisão e edição.

### REFERÊNCIAS

- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001; 122(4):497–506. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220497.22223>.
- Alavi, S. M.; Drozd, B.; Hatef, A.; Flajshans, M. Sperm morphology, motility, and velocity in naturally occurring polyploid European weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.). *Theriogenology*, v. 80, n. 2, p. 153-160, 15 jul. 2013.
- Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*. 2004; 25(3):317–325.
- Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014; 81:5–17.
- Barth, A. D.; Oko, R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- Billard R, Bieniarz K, Popek W, Epler P, Breton B, Alagarswami K. Stimulation of gonadotropin secretion and spermiation in carp by pimoziide-LHR-A treatment: effects of dose and time of day. *Aquaculture*. 1987; 62:161–170.
- Billard R. Artificial insemination in fish. In: Lamming GE, editor. *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4th ed. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1990b.
- Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Dev*. 1986; 26:877–920.

- Billard R. Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming GE, editor. *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4th ed. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1990a.
- Celeghini, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*. 1972; 52:198–236.
- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dreanno C, Suquet M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C, editor. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Vienna, IL: Cache River Press; 1999.
- Cosson J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J Fish Biol*. 2010; 76(1):240–279.
- Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac Int*. 2004; 12(1):69–85.
- Courot M, Reviere MTH, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, (Ed.). *The Testis*. New York: Academic Press, 1970.
- Ewing H. Spermatogenesis in zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Anat Rec*. 1972; 172:308.
- Fauvel C, Suquet M, Cosson J. Evaluation of fish sperm quality. *J Appl Ichthyol*. 2010; 26:636–643.
- Felizardo VO, Mello RA, Murgas LDS, Andrade ES, Drumond MM, Rosa PV. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim Reprod Sci*. 2010; 122(3–4):259–263.
- Gallego V, Asturiano JF. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: A historical approach. *Rev Aquac*. 2018; 1–28.
- Gallego V, Herranz-Jusado JG, Rozenfeld C, Pérez L, Asturiano JF. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: When the technique and technicians matter. *Fish Physiol Biochem*. 2018; 44:1457–1467.

- Garner, D. L.; Thomas, A. C.; Gravance, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 34, p. 399-404, 1999.
- Gravance, C. V.; Garner, D. L.; Baumber, J. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, v. 53, p. 1691-1703, 2000.
- Kime D, Van Look K, McAllister B, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (SCA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol C*. 2001; 130:425–433.
- Linhart, O.; Rodina, M.; Flajshans, M.; Mavrodiev, N.; Nebesarova, J.; Gela, D.; Kocour, M. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International*, v. 14, n. 1-2, p. 9-25, 2006.
- Medina SPV. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza. 2008.
- Miliorini AB. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, MG. 2006.
- Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*. 1997; 3(5):403–39.
- Murgas LDS, Felizardo VO, Ferreira MR, Andrade ES, Veras GC. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Rev Bras Reprod Anim*. 2011; 35(2):186–91.
- Neumann G, Bombardelli RA, Rebechi de Toledo CP, Sanches EA. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre. Os Autores, Toledo, PR, Brasil. 2013.
- Purchase CF, Earle PT. Modifications to the ImageJ computer assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. *J Appl Ichthyol*. 2012; 28:1013–6.
- Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 2004; 234:1–28.

- Sanches EA, Bombardelli RA, Baggio DM, Sykora RM, Xavier AMM. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis áspera*). *Rev Bras Reprod Anim.* 2011; 35(3):357–62.
- Serres C. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.* 1984; 9:183–95.
- Shibata N, Hamaguchi S. Evidence for the sexual bipotentiality of spermatogonia in the fish, *Oryzias latipes*. *J Exp Zool.* 1988; 245:71–77.
- Tabares J, Tarazona A, Oliveira M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2005; 18(2):149–61.
- Verstegan J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002; 57:149–79.
- Vieira MJAF, Carvalho MAM, Salmito-Vanderley CSB, Salgueiro CCM, Viveiros ATM, Moura AAAN, Nunes JF. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. *Arch Zootec.* 2011; 60(232):1263–70.
- Viveiros ATM, Fessehay Y, ter Veld M, Schulz RW, Komen J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture.* 2002; 213:373–86.
- Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem.* 2009; 35(1):137–50.
- Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology.* 2010; 74:551–6.
- Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology.* 2007; 67:661–72.
- Yao, Z.; Richardson, G.; Crim, L. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*, v. 174, p. 183–193, 1999.

CAPÍTULO III – Coletas sucessivas de sêmen de *Piaractus mesopotamicus* em tecnologia de bioflocos durante o período reprodutivo

Artigo publicado

DOI: 10.1016/j.anireprosci.2025.107821.

Coletas sucessivas de sêmen de *Piaractus mesopotamicus* em tecnologia de bioflocos durante o período reprodutivo

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar as características espermáticas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mantido em tecnologia de bioflocos (BFT) em comparação ao sistema com renovação parcial de água (PWR). Foram utilizados 25 machos em dois sistemas de produção: 12 em BFT e 13 em PWR. Os peixes foram induzidos a se reproduzir em dois momentos (1) antes da distribuição nas unidades experimentais de ambos os sistemas; e (2) após a manutenção dos reprodutores por 42 dias nos sistemas. Após 42 dias, apenas 23% dos peixes liberaram sêmen em PWR e 75% em BFT. Essa melhora na reprodução dos reprodutores de pacu mantidos em BFT pode ser corroborada pelo maior índice gonadossomático ( $P < 0,05$ ) dos reprodutores mantidos em BFT (0,387) em comparação aos mantidos em PWR (0,135), e devido aos estágios mais avançados de células germinativas (espermatócitos, espermátides, espermatozoides) nos testículos dos reprodutores mantidos em BFT por 42 dias. Apesar da diminuição da concentração de espermatozoides em BFT da primeira para a segunda coleta, o número total de espermatozoides não diferiu significativamente. Apenas três reprodutores liberaram sêmen após serem mantidos em PWR por 42 dias e a integridade da membrana plasmática associada ao potencial mitocondrial foi pior para esses reprodutores em comparação aos peixes mantidos em BFT. A quantidade total de espermatozóides produzidos por reprodutores em BFT foi superior (46.406) que aqueles mantidos em PWR (304). Em conjunto, os resultados obtidos sinalizam que a manutenção de reprodutores de pacu induzido em BFT é mais indicada que em PWR. A manutenção de reprodutores de pacu em BFT por 42 dias é mais adequada para reprodução induzida em situações de coletas sucessivas de sêmen em comparação ao sistema PWR, com melhor otimização hídrica.

**Keywords:** Biofloc Technology; Computer-assisted sperm analysis; Fish reproduction; Rheophilic fish; Successive seminal collections

Successive seminal collections from *Piaractus mesopotamicus* in biofloc technology during the reproductive period

**ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the sperm characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) maintained in biofloc technology (BFT) in comparison partial water renewal system (PWR). Twenty-five males in two production systems were used: 12 in BFT and 13 in PWR. The fish were induced to reproduce in two moments: before the distribution in the experimental units of both systems; and after maintenance of the breeders for 42 days in the systems. After 42 days, only 23% of PWR fish released semen, compared to 75% of those kept in BFT. This improvement in the reproduction of pacu broodstock kept in BFT can be corroborated by the higher ( $P < 0.05$ ) gonadosomatic index of broodstock kept in BFT (0.387) compared to those kept in PWR (0.135), and also due to more advanced germ cell stages (spermatocytes, spermatids, spermatozoa) in broodstock testes maintained in BFT at 42 days. Despite a decrease in sperm concentration in BFT from the first to the second collection, the total number of spermatozoa did not differ significantly. Although only three broodstock released semen after being kept in PWR for 42 days, plasma membrane integrity associated with mitochondrial potential was worse for these broodstock compared to those fish kept in BFT. The total amount of spermatozoa produced per liter of water used in BFT was 46,406, surpassing 304 of PWR's system. Maintaining pacu breeders in BFT for 42 days is more suitable for induced reproduction in situations of successive semen collections compared to the PWR system, with improved water optimization.

**Keywords:** Biofloc Technology; Computer-assisted sperm analysis; Fish reproduction; Rheophilic fish; Successive seminal collections

## 1. Introdução

O aumento da piscicultura no mundo tem sido notável, especialmente com o crescimento da produção de espécies como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e diversas carpas (família Cyprinidae; FAO, 2022). Apesar da notoriedade produtiva dessas espécies, as espécies Sul-americanas, de grande importância cultural e econômica, têm recebido menor destaque. No Brasil, a produção aquícola totalizou 617 mil toneladas em 2022, das quais apenas aproximadamente 26,5% foram originadas de espécies de peixes nativos e seus híbridos (IBGE, 2022). A principal razão para essa discrepância é a ausência de pacotes tecnológicos adequados para a criação dessas espécies, enquanto tilápias e carpas se beneficiam de décadas de pesquisa e desenvolvimento que resultaram em técnicas otimizadas de reprodução, alimentação e manejo, as espécies sul-americanas carecem de investimentos semelhantes em tecnologia e infraestrutura, o que limita sua produtividade e expansão na piscicultura global (Torrans e Ott, 2018).

Entre as grandes dificuldades para o aumento na produção de espécies nativas está o fato de serem reofílicas, dificultando a reprodução em cativeiro. Assim, os gargalos produtivos de peixes nativos se concentram na ausência de protocolos mais adequados para a obtenção de formas jovens em quantidade e qualidade, uma vez que a criação bem-sucedida dessas espécies depende de técnicas reprodutivas avançadas e do manejo adequado dos estágios iniciais de vida, áreas onde ainda há lacunas significativas em termos de pesquisa e desenvolvimento (Jomori et al., 2005). Portanto, o desenvolvimento, aprimoramento e implementação de protocolos reprodutivos são fundamentais para o sucesso produtivo em si, e de forma a possibilitar a identificação, seleção e utilização de peixes de maior valor genético para as diferentes características produtivas, tornando-as espécies mais competitivas no mercado (Nguyen, 2016). Sem esses avanços tecnológicos, a capacidade de atender à demanda crescente pelo sucesso reprodutivo dessas espécies permanece limitada, impactando negativamente o potencial de crescimento da piscicultura.

Entre as espécies neotropicais sul-americanas de grande importância, destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Trata-se de uma espécie migradora (Lima et al., 2013) que, portanto, necessita de indução hormonal para reprodução em cativeiro/sistema de produção intensivo. Apesar disso, é uma espécie de boa

adaptabilidade à produção em cativeiro, apresentando bons índices produtivos, rápido crescimento, além de ser um peixe de hábito alimentar onívoro que pode ser alimentado com uma grande variedade de dietas de menor custo (Castagnolli and Zuim, 1985). Tais fatores torna a espécie e seus híbridos uma escolha popular entre os aquicultores, contribuindo significativamente para a sustentabilidade e rentabilidade da piscicultura na América do Sul. Entretanto, assim como outras espécies Sul-Americanas, ainda há carência no desenvolvimento de protocolos reprodutivos que maximizem a produtividade e competitividade da espécie.

O cultivo de organismos aquáticos em tecnologia de bioflocos (BFT) tem sido bastante utilizado no mundo, tendo-se em vista a redução da necessidade de troca de água do sistema, sendo considerado, portanto, um ambiente de produção sustentável (Emerenciano et al., 2017). Além disso, estudos investigando o desempenho produtivo indicam que este sistema de cultivo pode melhorar os índices zootécnicos no cultivo de várias espécies, como carpa, tilápia, camarão, bem como espécies de peixes nativos, como pacu e dourado. Adicionalmente, alguns estudos recentes indicam que a manutenção de reprodutores em sistemas BFT melhora aspectos reprodutivos e/ou facilita a produção de juvenis de peixes, como a tilápia do Nilo (Ekasari et al., 2015) e o bagre africano (*Clarias gariepinus*; Ekasari et al., 2016), além de favorecer a reprodução do camarão marinho (Emerenciano et al., 2014; Cardona et al., 2016). Além disso, resultados positivos nas características reprodutivas têm sido observados em algumas espécies de peixes neotropicais sul-americanos, como o lambari (Lima, 2022; Valandro, 2023). A adoção de tecnologias de produção mais sustentáveis do ponto de vista ambiental tem ganhado atenção crescente. A tecnologia de bioflocos (BFT) é um exemplo notável, especialmente considerando que essa abordagem minimiza ou elimina a troca de água, enquanto os (Mansour e Esteban, 2017; Haraz et al., 2023; Khanjani, Sharifinia e Hajirezaee, 2022; Van Doan et al., 2021; Yu et al., 2023).

Apesar das pesquisas sugerirem que o BFT pode contribuir para o sucesso reprodutivo de várias espécies, o que pode estar associado agregados à constante disponibilidade de bioflocos os quais podem ser consumidos pelos peixes e potencializar a resposta imune, características espermáticas em reproduções

sucessivas de pacus mantidos por 42 dias em tecnologia de bioflocos ainda não foram investigadas.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Alocação*

O experimento foi conduzido na estação experimental de piscicultura da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (20°29'58.2" S e 54°36'52.3" W). A metodologia utilizada neste estudo foi previamente aprovada pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (aprovação No. 1083/2019).

Antes do período reprodutivo, os reprodutores foram mantidos em tanques escavados de 1.000 m<sup>2</sup>, em densidade de estocagem em torno de 0,2 peixes/m<sup>2</sup>, com renovação contínua de água de 10% ao dia. Os animais foram alimentados com ração extrusada (Supra<sup>®</sup>, 32% PB e 14 mm) para peixes onívoros uma vez ao dia em quantidade equivalente a 2% da biomassa do tanque, e a temperatura do tanque se manteve em média de 29,51 ± 1,58 °C, com 8,02 ± 0,18 mg/L de oxigênio dissolvido e pH em 6,47 ± 1,86. As condições ambientais para temperatura máxima e mínima do ar, e pluviosidade foram 30,98°C, 23,80°C e 2,91 mm, respectivamente (CEMTEC/MS).

### *2.2. Desenho experimental*

Um total de 25 machos de pacu (1,77 ± 0,26 kg) em idade reprodutiva (entre 3 e 4 anos de idade) foram selecionados de acordo com as recomendações de Araújo et al. (2014). Brevemente, os peixes foram identificados por meio de microchip (AnimalTAG<sup>®</sup>), submetidos à coleta de sêmen e distribuídos aleatoriamente em dois sistemas de produção: (i) com renovação parcial de água (PWR) e; (ii) tecnologia de bioflocos (BFT). Cada tratamento foi conduzido utilizando dois tanques de concreto totalmente revestidos de 10 m<sup>3</sup> (2 x 5 m) por tratamento, com um intervalo de sete dias entre cada estocagem dos grupos de peixes nos tanques. Cada grupo continha de dois a quatro indivíduos, e apenas os machos que liberaram sêmen com sucesso

no dia 0 foram considerados para o experimento (Figura 1). Para todas as análises, cada peixe foi considerado uma unidade experimental. O estudo teve início com a coleta de sêmen no dia 0, após a devida preparação das unidades experimentais, especialmente garantindo a maturação do sistema BFT.

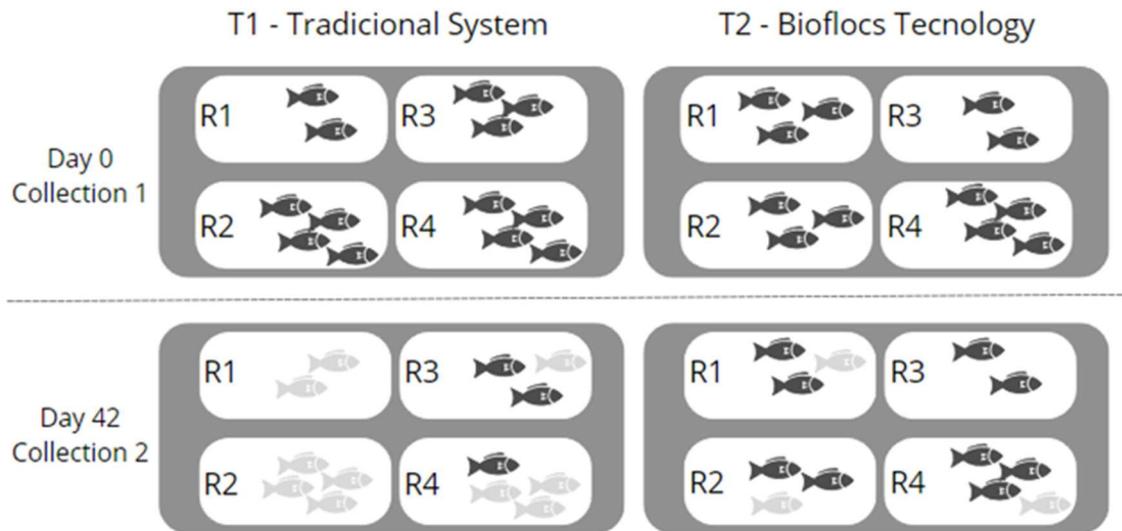


Figura 1. Distribuição das unidades experimentais nos dois diferentes tratamentos (sistema com troca parcial de água – PWR e sistema de bioflocos – BFT). Em cinza escuro estão representados os animais que espermiaram com sucesso e em cinza claro aqueles que não espermiaram ou não produziram quantidade suficiente de sêmen para análises (<math><10 \mu\text{L}</math>).

Para a formação e manutenção do sistema de bioflocos foi utilizada a metodologia adaptada de Emerenciano et al. (2012), sendo utilizado o melaço líquido como fonte de carbono na relação (C:N) de 20:1 e manutenção de volume de sólidos suspensos e a salinidade em 20 mL/L e 3 g/L em média, respectivamente. Durante o período de formação dos flocos, realizou-se o aporte diário da fonte de carbono ao sistema para o desenvolvimento das bactérias heterotrófica e quimioautotróficas. O sistema de bioflocos foi considerado maduro quando os níveis de nitrogênio amoniacal total e nitrito atingiram valores próximos a zero e a presença de nitrato foi detectada. Após a maturação da BFT, adotou-se a relação C:N de 6:1, com adição de melaço

(líquido) apenas quando teores de nitrogênio amoniacal total (NAT) acima de 1 mg/L foram detectados, conforme recomendação de Ebeling et al. (2006).

No sistema produtivo PWR foi utilizado uma troca parcial de água de 10% ao dia, com oxigenação semelhante àquela utilizada em BFT. Ambos os sistemas dispunham de oxigenação através de sistema de mangueiras porosas (8 metros por unidade experimental; Aquadrop®) no fundo dos tanques alimentados por soprador de 2.04 HP de potência e cobertos com sombrite 50% para diminuir a incidência de luminosidade

### *2.3. Qualidade de água dos sistemas BFT e PWR*

Os animais foram alimentados diariamente (duas vezes ao dia) até a saciedade aparente, sem o acúmulo de sobras nos tanques, com ração do mesmo lote usado durante o período prévio ao experimento. Os valores de temperatura (°C), oxigênio (mg/L), pH (HANNA HI98107) e sólidos suspensos (mL/L; cone de Imhoff) foram mensurados diariamente. Os valores de nitrogênio amoniacal total (mg/L; NAT), amônia tóxica (mg/L; NH<sub>3</sub>), nitrito (mg/L; NO<sub>2</sub>), nitrato (mg/L; NO<sub>3</sub>; kits colorimétricos) e alcalinidade (mg CaCO<sub>3</sub>/mL; titulação) foram mensurados semanalmente.

Os valores de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e alcalinidade estiveram dentro do intervalo aceitável para a espécie (descrever os valores para a espécie) em sistemas PWR (Boyd, 1998) e BFT (Emerenciano et al., 2017). Quanto aos compostos nitrogenados, apenas o nitrito foi um pouco superior à concentração recomendada em PWR na última semana (<0,3 mg/L; Boyd, 1998), enquanto que em BFT, os níveis de todos os compostos nitrogenados ficaram dentro do recomendado para BFT (Emerenciano et al., 2017; Figura 2). Para evitar possíveis problemas com intoxicação por nitrito, cloreto de sódio (3 g/L) foi adicionado à todas as unidades experimentais.

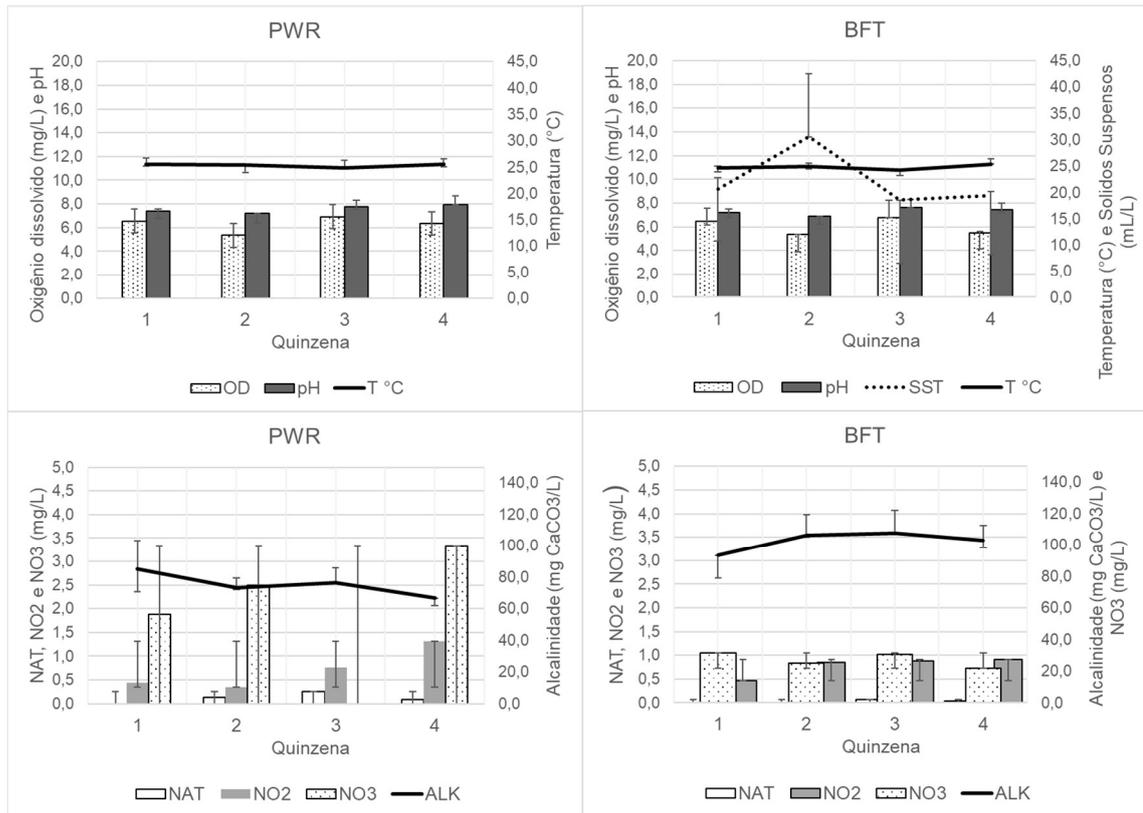


Figura 2. Índices de qualidade de água ao longo das quatro quinzenas do período experimental para os dois sistemas de produção (PWR e BFT). NAT - nitrogênio amoniacal total (mg/L); NO<sub>2</sub> - nitrito (mg/L), NO<sub>3</sub> - nitrato (mg/L) e ALK - alcalinidade (mg CaCO<sub>3</sub>/mL).

Ao final do período experimental, foram realizadas as análises bromatológicas dos flocos no BFT, a partir de um pool (120 g) contendo amostras de bioflocos de todos os tanques, de acordo com a metodologia de Detmann et al. (2021). Os flocos apresentaram 91,92% de matéria seca, 26,80% de matéria mineral (com base na matéria seca), 42,39% de proteína bruta e 2,27% de extrato etéreo.

#### 2.4. Indução hormonal

O manejo reprodutivo ocorreu durante o período reprodutivo da espécie, entre os meses de janeiro e março. Os peixes que apresentaram características reprodutivas evidenciadas (emissão de sêmen, de coloração branca e aparência densa, fluido e abundante após leve pressão no abdômen) (Woynarovich and Woynarovich, 1998) foram selecionados e transportados para o laboratório de

reprodução e mantidos em caixas d'água de 500L (4 caixas – 4 peixes por caixa) para proceder a coleta do sêmen. A água das caixas foi mantida em temperatura média de  $26.6 \pm 0.9$  °C e com  $8.6 \pm 1.6$  mg/L de oxigênio dissolvido durante as coletas de sêmen.

A reprodução foi induzida pela imposição de um regime de tratamento hormonal que foi previamente descrito por Souza et al. (2018). Brevemente, antes de cada coleta, os animais receberam injeção intraperitoneal (base da nadadeira peitoral) de CPH na dose única de 2,5 mg/kg de peso corporal, diluído em 0,25 mL de solução salina/kg de peso corporal do peixe.

### *2.5. Características reprodutivas*

Após atingir 240 a 270 horas-grau (aproximadamente 8,5 horas da dose hormonal) (Bernardino, Alcântara and Senhorini, 1990), os animais foram submetidos a anestesia com eugenol (50 mg/L definido por Zimba et al., 2017) e a extrusão foi realizada através de massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal. Apesar de, nos machos, a função do hormônio é de aumentar o volume do sêmen expelido, este valor de horas-grau se baseia na recomendação de Ceccarelli, Senhorini e Volpato (2000) e Bernardino, Alcântara and Senhorini, 1990 para extrusão de fêmeas de *P. mesopotamicus*, momento este em que é colhido o sêmen para fertilização dos óvulos, sendo assim, o mesmo procedimento recomendado para fêmeas foi adotado para machos. As alíquotas de sêmen (1 mL) foram coletadas individualmente e imediatamente após a extrusão em cada peixe.

As amostras seminais foram mantidas resfriadas em caixas de isopor a 4 °C sem contato direto com o gelo para transporte conforme metodologia adaptada de Spica et al. (2024). O sêmen fresco também foi fixado utilizando o protocolo descrito por Sanches et al. (2011) para determinar a concentração espermática. Variáveis de qualidade espermática foram obtidas através do CASA-SCA® (Sperm Class Analyzer). As avaliações de integridade da membrana plasmática e potencial mitocondrial foram realizadas através de procedimentos em citometria de fluxo.

### 2.5.1. Concentração espermática

Para determinar a concentração espermática, 1  $\mu\text{L}$  de sêmen foi diluído em 2.000  $\mu\text{L}$  de formaldeído salino tamponado a 4,6% (1:2.000). A contagem de células foi realizada de acordo com a metodologia de Sanches et al. (2011), utilizando uma câmara hematimétrica de Neubauer. O cálculo do número de espermatozoides por mL de sêmen foi realizado seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para sêmen de mamíferos. A produção total de espermatozoides (PTSptz) foi determinada pelo produto da multiplicação entre a concentração espermática e do volume de sêmen produzido por cada macho.

### 2.5.2. Análise espermática computadorizada assistida (CASA)

No laboratório, a análise foi realizada pelo método computadorizado CASA (Computer Assisted Semen Analysis - modelo Sperm Class Analyzer – SCA) com parâmetros ajustados para análise de sêmen de peixes. Foram considerados móveis os espermatozoides com VSL, VAP e VCL acima de 3, 10 e 15  $\mu\text{m/s}$ , respectivamente. Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de sêmen foi colocada em um microtubo e ativada com água destilada na proporção de 1:100. Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  dessa solução (sêmen + água destilada) foram colocadas em uma câmara de contagem de células Makler® e analisadas usando o sistema SCA. O momento da avaliação foi exatamente em 10 segundos após a ativação.

Foram mensuradas a taxa de motilidade espermática total (MOT Total, %; relação entre os espermatozoides considerados móveis e o número total de espermatozoides no campo de visão), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade da célula ao longo da trajetória ponto a ponto), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade calculada a partir do deslocamento representado pela linha reta entre o ponto inicial e o ponto final da trajetória), velocidade média de deslocamento (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade calculada levando em consideração o deslocamento médio entre os pontos individuais da trajetória ponto a ponto do espermatozoide), linearidade (LIN, %; razão percentual de VSL/VCL), retilinearidade (STR, %; razão percentual de divisão VSL/VAP), oscilação (WOB, %; oscilação entre a trajetória ponto a ponto e a trajetória média, calculada a partir da razão percentual de VAP/VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ) e frequência de batimento transposto

(BCF, Hz; número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento; Verstegen et al., 2002).

### 2.5.3. Citometria de fluxo

Os procedimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o equipamento CytoFLEX™ (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA) equipado com laser azul (488 nm, 100 mW), vermelho (640 nm, 40 mW) e violeta (405 nm, 100 mW) e os dados foram analisados por meio do software CytExpert Acquisition (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). Para a leitura no citômetro de fluxo, todas as amostras de sêmen foram diluídas a uma concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL em solução tampão TALP-PVA (100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6 mM DL 60% de lactato de sódio, 2,0 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10,0 mM de HEPES, 1,0 mM de piruvato de sódio e 1,0 mg/mL de álcool polivinílico-PVA) de acordo com Carneiro et al. (2018), seguido de 7 µM de Hoechst 33342 (H33342; Thermo Scientific, Fisher, IL, EUA – H1399).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática foi utilizada a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, EUA – P4170),. Adicionou-se ao tubo com a amostra a alíquota de 2µL (50 µg/mL) de PI e, no mesmo tubo, para a avaliação do potencial mitocondrial, foi adicionada 0,2 µL (20 nM) da sonda fluorescente MitoStatus Red (MST; BD Pharmingen™), cuja emissão de fluorescência indica o alto potencial da membrana mitocondrial. A amostra foi incubada por 30 min a 30°C protegida da luz. Ao final desse período, a amostra foi avaliada em citômetro de fluxo para análise da emissão de fluorescência. Em associação ao iodeto de propídio, os espermatozoides foram classificados em membrana plasmática íntegra (PI-), membrana plasmática lesada (PI+), membrana plasmática com baixo potencial mitocondrial (MTS-), membrana plasmática com alto potencial mitocondrial (MTS+), membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial (PI+MTS+), membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial (PI+MTS-), membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial (PI- MTS-) e membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial (PI-MTS+).

Para cada ensaio, pelo menos 10.000 células foram avaliadas pelo citômetro de fluxo para cada amostra. Os dados foram gerados em formato de gráfico de histograma, o que permitiu a visualização de todos os eventos visíveis, devidamente compensados pelo software de citômetro de fluxo.

#### *2.6. Morfologia, histologia e análise estereológica de gônadas*

Após a coleta do sêmen, seis animais provenientes de PWR e sete de BFT foram eutanasiados por secção medular. A partir da papila urogenital foi feito um corte ventral no sentido póstero-anterior para a retirada dos testículos. Foram registrados os dados de comprimento (cm), largura (cm) e peso (g) de cada testículo, e os valores do índice gonadosomático (IGS, %) foram estimados através da relação percentual entre o peso dos testículos e o peso do macho. Fragmentos de três regiões dos testículos (proximal, medial e distal) foram coletados e, imediatamente, fixados em solução de glutaraldeído a 2.5% em tampão de bifosfato de potássio pH. 7.2, por 24 horas e, em seguida, mantidos em solução de álcool 70%. Na sequênica, os testículos foram incluídos em metacrilato glicol, e submetidos a secções de 3 µm em micrótomo rotativo manual (Lupetec MRP) para confecção das lâminas. Essas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas com microscópio óptico (Nikon, Eclipse).

As fases reprodutivas foram descritas baseadas em Siqueira-Silva et al. 2013. As análises histológicas qualitativas foram realizadas com o intuito de se avaliar a arquitetura do testículo de pacus mantidos nos diferentes sistemas de produção (PWR e BFT). Estas análises abrangeram a distribuição e o posicionamento dos túbulos seminíferos nos testículos e a identificação morfológica dos principais tipos celulares, como células de Sertoli, células de Leydig e diferentes gerações de células germinativas, através de parâmetros já bem estabelecidos na literatura (Russell et al., 1990; Pudney, 1993; Pudney, 1996; De Rooij & Russell, 2000; Vilela et al., 2003; Leal et al. 2009; Schulz et al., 2009).

A análise estereológica foi realizada utilizando uma grade de intersecção de 420 pontos (Motic Image Plus 2.0<sup>®</sup>), sobreposto a uma área da secção histológica obtida a partir da região central dos testículos. Cada grade é equivalente a um campo. Cinco campos (2.100 pontos) foram contados, aleatoriamente, para cada animal analisado, sob microscopia de luz com magnificação de imagem de 400x. Foram

quantificados os tipos celulares marcados: espermatogônia, espermatócito, espermátide, espermatozoide, interstício e lúmen sem células.

### *2.7. Análise estatística*

Todas as variáveis dependentes foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Após a confirmação desses pressupostos, as variáveis dependentes foram analisadas por meio de um modelo bifatorial (ANOVA - Two Way).

Para as variáveis cinéticas, quantitativas, de integridade de membrana e atividade mitocondrial, as amostras foram pareadas por peixe (antes e depois), considerando o efeito do peixe como uma variável interferente controlada. As análises foram realizadas para cada sistema (PWR e BFT) de forma independente. Para as variáveis morfológicas, os peixes foram considerados a unidade experimental tendo como variáveis independentes os "tratamentos" e "semanas", onde "tratamento" define os dois sistemas (BFT e PWR), e as semanas de entrada no estudo foi uma variável interferente controlada. Os resultados obtidos para o IGS em cada sistema foram comparados ao valor reportado por Oliveira et al. (1997) por meio do teste t de Student para uma amostra.

As variáveis dependentes relacionadas à estereologia foram analisadas por um modelo com uma variável independente (Anova - One Way, tratamentos, equivale ao Teste t de Student para amostras independentes). Cada peixe foi considerado como unidade experimental.

Todas as análises foram realizadas seguindo as recomendações de Zar (2010) e utilizando o software Statistical Analysis System (SAS, 2002). O nível de significância adotado foi de 0,05 para todos os testes.

## **3. Resultados**

Todos os reprodutores induzidos à reprodução, espermiaram anteriormente à alocação nos sistemas de produção PWR (13 reprodutores; 100%) e BFT (12 reprodutores; 100%), liberaram sêmen. Após manutenção dos reprodutores por 42

dias nos dois sistemas produtivos, três reprodutores do sistema PWR (23%) e nove reprodutores do sistema BFT (75%) espermiaram após uma nova indução reprodutiva (Figura 3).

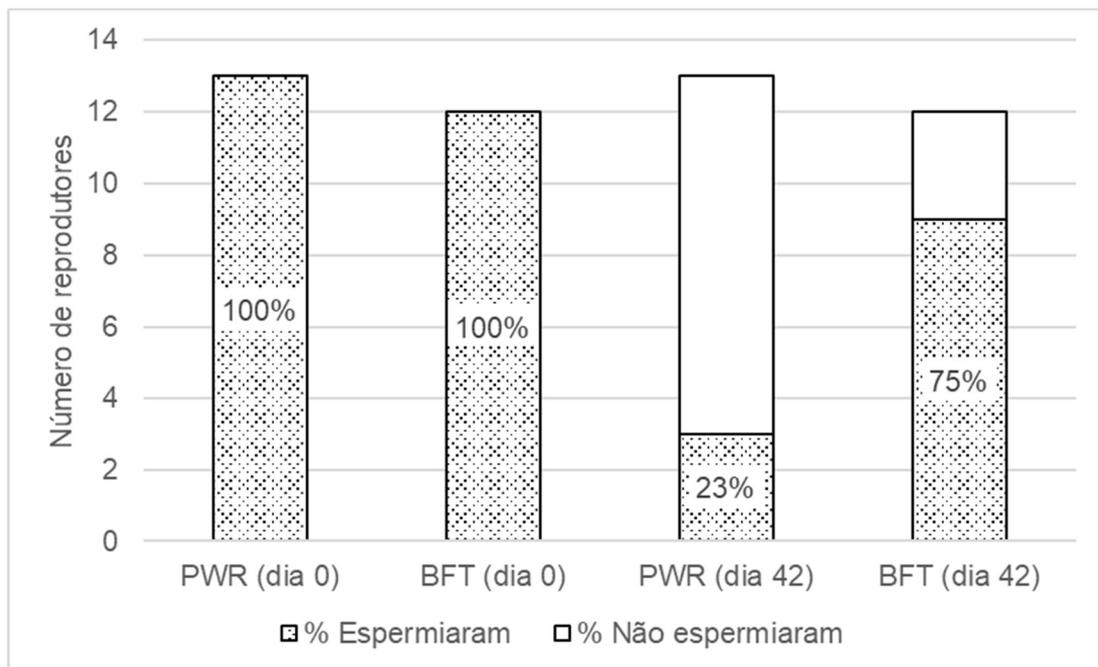


Figura 3. Número e porcentagem de pacus que espermiaram após reprodução induzida em dois momentos: anteriormente aos reprodutores serem alocados nas unidades experimentais, e após 42 dias de manutenção dos sistemas com renovação de água (PWR) ou sistema tecnologia de bioflocos (BFT).

Não houve diferença significativa para as variáveis qualitativas e quantitativas do sêmen dos reprodutores induzidos à reprodução no início do experimento (anteriormente a alocação nas unidades experimentais; n=9) comparativamente aos reprodutores que foram induzidos à reprodução após manutenção em sistema PWR por 42 dias (n=3) (Tabela 1). Por outro lado, a concentração de espermatozoides nos reprodutores induzidos à reprodução no início do experimento (anteriormente a alocação nas unidades experimentais; n=12) comparativamente aos reprodutores que foram induzidos à reprodução após manutenção em sistema BFT por 42 dias (n=9). As demais características quantitativas do sêmen (volume de sêmen e produção total

de espermatozoides), características qualitativas, atividade mitocondrial e de integridade de membrana não diferiram significativamente entre os dois momentos de análise (anterior e após a manutenção por 42 dias em BFT; Tabela 2).

Em geral as características seminais dos reprodutores em PWR (n=3) e BFT (n=9) não diferiram significativamente, exceto quanto à atividade mitocondrial e integridade de membrana, em que os melhores resultados foram obtidos para os reprodutores mantidos em BFT ( $P < 0,05$ ). Esse resultado é subsidiado pela menor porcentagem de células com baixo potencial mitocondrial (MTS-), maior porcentagem de células com alto potencial mitocondrial (MTS+) e de células com membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial (PI-MTS+) observados nos reprodutores mantidos por 42 dias em BFT comparativamente aos reprodutores mantidos em PWR.

O índice gonadossomático dos reprodutores mantidos em BFT (n=7) foi maior ( $p < 0,05$ ) que aqueles em PWR (n=5). Ao comparar estatisticamente os resultados encontrados no presente estudo com os resultados encontrados por Oliveira et al. (1997) em PWR, verificou-se que esse valor de IGS de testículos de *P. mesopotamicus* coletados no mesmo período da estação reprodutiva (fevereiro) foi igual ( $P > 0,05$ ) ao IGS dos animais mantidos em PWR e menor ( $P < 0,05$ ) que o IGS dos animais mantidos em BFT (Tabela 3, Figura 4 e Figura 5).

**Tabela 1.** Médias das características quantitativas do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* em duas coletas realizadas no mesmo período reprodutivo, após manutenção em sistemas BFT ou PWR por 42 dias.

Características seminais <sup>(1)</sup>	PWR Coleta 1 (n=3)	PWR Coleta 2 (n=3)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>	BFT Coleta 1 (n=9)	BFT Coleta 2 (n=9)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>	PWR Coleta 2 (n=3)	BFT Coleta 2 (n=9)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>
VOL	0,92	0,77	106,02	0,856	2,04	5,17	81,02	0,053	0,88	2,06	62,79	0,152
CONC	2,35	1,28	24,03	0,942	2,29 a	1,74 b	8,53	<0,001	2,27	2,31	18,02	0,884
PTSptz	2,24	1,05	129,04	0,564	4,90	10,31	92,98	0,143	2,00	4,98	76,03	0,206

(1) VOL, volume seminal (mL); CONC, concentração espermática ( $10^9$  espermatozoides/mL); PTSptz, produção total de espermatozoides ( $10^9$  spermatozoides); (2) Valor de p da ANOVA para VOL, CONC e PTSptz. Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste T de student para amostras independentes, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 2.** Médias das características qualitativas do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* em duas coletas realizadas no mesmo período reprodutivo, após manutenção em sistemas BFT ou PWR por 42 dias.

Características seminais <sup>(1)</sup>	PWR Coleta 1 (n=3)	PWR Coleta 2 (n=3)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>	BFT Coleta 1 (n=9)	BFT Coleta 2 (n=9)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>	PWR Coleta 2 (n=3)	BFT Coleta 2 (n=9)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>
MOT (%)	86,57	60,19	30,01	0,280	89,17	74,60	26,44	0,191	86,88	89,07	10,56	0,738
VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	51,05	70,21	29,97	0,326	56,30	60,93	18,70	0,397	50,73	56,41	32,23	0,645
VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	24,59	32,85	42,82	0,497	28,68	28,59	15,18	0,967	24,95	28,56	38,76	0,632
VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	39,72	59,03	35,17	0,306	44,83	49,48	17,17	0,258	39,86	44,78	38,51	0,676
LIN (%)	48,63	48,31	14,95	0,961	50,61	48,69	18,28	0,665	49,34	50,37	8,19	0,858
STR (%)	62,62	58,14	9,70	0,448	63,96	59,41	11,19	0,200	63,24	63,76	8,81	0,895

Características seminais <sup>(1)</sup>	PWR Coleta 1 (n=3)	PWR Coleta 2 (n=3)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>	BFT Coleta 1 (n=9)	BFT Coleta 2 (n=9)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>	PWR Coleta 2 (n=3)	BFT Coleta 2 (n=9)	CV (%)	P- valor <sup>(2)</sup>
WOB (%)	77,51	83,11	4,87	0,222	78,55	81,24	7,01	0,339	77,92	78,41	9,09	0,922
ALH (%)	2,12	1,80	12,00	0,241	2,09	1,98	22,06	0,618	2,05	2,12	23,91	0,839
BCF (Hz)	5,88	6,92	31,14	0,590	5,58	5,70	9,20	0,643	5,85	5,59	5,17	0,222
PI- (%)	87,57	84,90	21,70	0,877	86,06	85,44	18,43	0,936	89,69	85,36	12,71	0,576
PI+ (%)	12,43	15,10	135,91	0,877	13,94	14,56	110,9	0,936	10,31	14,64	81,03	0,576
MTS- (%)	84,92	96,77	7,08	0,153	65,75	79,74	19,99	0,076	<b>85,26 a</b>	<b>65,63 b</b>	16,61	0,036
MTS+ (%)	15,08	3,23	70,21	0,153	34,25	20,26	53,35	0,076	<b>14,74 b</b>	<b>34,37 a</b>	39,77	0,036
PI+MTS+ (%)	1,24	0,40	158,81	0,515	3,30	2,74	77,81	0,621	1,36	3,26	71,38	0,192
PI+MTS- (%)	10,76	14,46	144,84	0,827	10,30	11,44	134,5	0,872	8,60	11,02	90,67	0,715
PI-MTS- (%)	75,79	84,27	31,27	0,718	59,14	74,28	38,21	0,243	78,59	58,21	31,14	0,163
PI-MTS+ (%)	12,21	0,87	102,59	0,174	27,26	11,54	80,20	0,064	<b>11,46 b</b>	<b>27,51 a</b>	44,24	0,049

(1) MOT, taxa de motilidade; VCL, velocidade curvilínea; VSL, velocidade em linha reta; VAP, velocidade média de deslocamento; LIN – linearidade; STR, retilinearidade; WOB, oscilação; BCF, frequência de batimento transposto; PI-, membrana plasmática íntegra; PI+, membrana plasmática lesada; MTS-, célula com baixo potencial mitocondrial; MTS+, célula com alto potencial mitocondrial; PI+MTS+, membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial; PI+MTS-, membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial; PI-MTS-, membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial; e PI-MTS+, membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial. (2) Valor de p da ANOVA para MOT, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF, VOL, CONC, PTSptz, PI-, PI+, MTS-, MTS+, PI+MTS+, PI+MTS-, PI-MTS- e PI-MTS+. Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste T de student para amostras independentes, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 3.** Médias para peso dos testículos e índice gonadossomático resultados da análise morfológica de testículos espermiados de *Piaractus mesopotamicus* mantidos em sistema de bioflocos (BFT) ou em sistema com troca parcial de água (PWR) analisados após segunda coleta de sêmen com intervalo de 42 dias.

	Média dos Tratamentos		CV%	P-value
	PWR	BFT		
Peso do peixe (Kg)	1,514	1,668	8,85	0,096
Peso do testículo Inteiro (g)	1,94 b	6,32 a	77,59	0,006
Peso do testículo Direito (g)	1,02	3,79	84,56	0,052
Peso do testículo Esquerdo (g)	1,03 b	2,68 a	54,50	0,027
Índice Gonadossomático (%)	0,133 b	0,395 a	57,00	0,0196

(1) Valor de  $p$  da ANOVA. Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste T de student para amostras independentes, ao nível de significância de 5%.

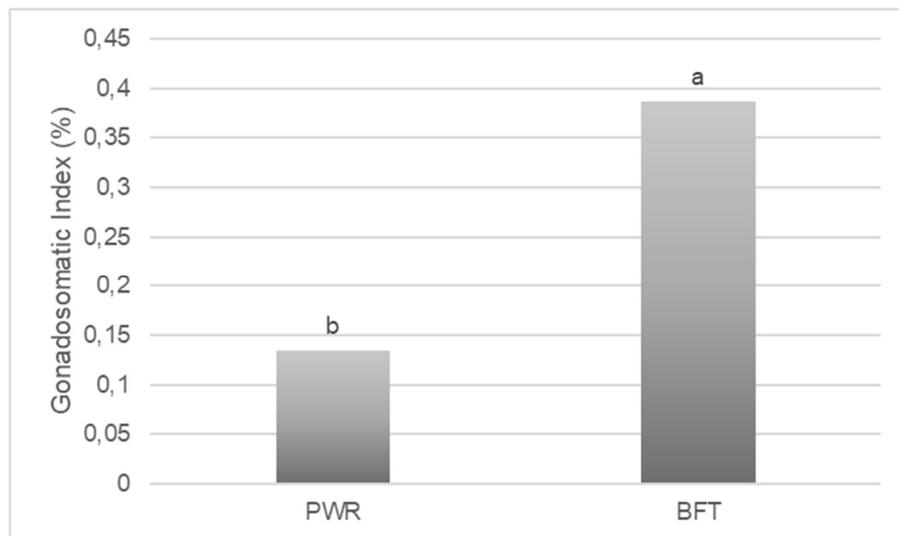


Figura 4. Índice gonadossomático (após coleta do sêmen) de testículos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após uma segunda reprodução induzida e manutenção por 42 dias em tecnologia de bioflocos (BFT) e em sistema com troca parcial de água (PWR). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística na comparação do retorno reprodutivo de cada grupo com o controle histórico pelo teste t de student para uma amostra, ao nível de significância de 5%.



Figura 5. Imagem ilustrativa evidenciando a diferença de comprimento de testículos de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após uma segunda reprodução induzida e manutenção por 42 dias em tecnologia de bioflocos (BFT; direita) e em sistema com troca parcial de água (PWR, esquerda).

Os reprodutores mantidos em PWR por 42 dias (n=6) apresentaram testículos esvaziados, com lúmen e interstício volumoso (Figura 6a), além de epitélio repleto de espermatogônias tronco (Figura 6b). Em contrapartida, os reprodutores mantidos por 42 dias em BFT (n=7) apresentaram testículos com cistos de células germinativas em espermatogênese (Figura 6c), bem como grande volume seminal no lúmen (Figura 6d).

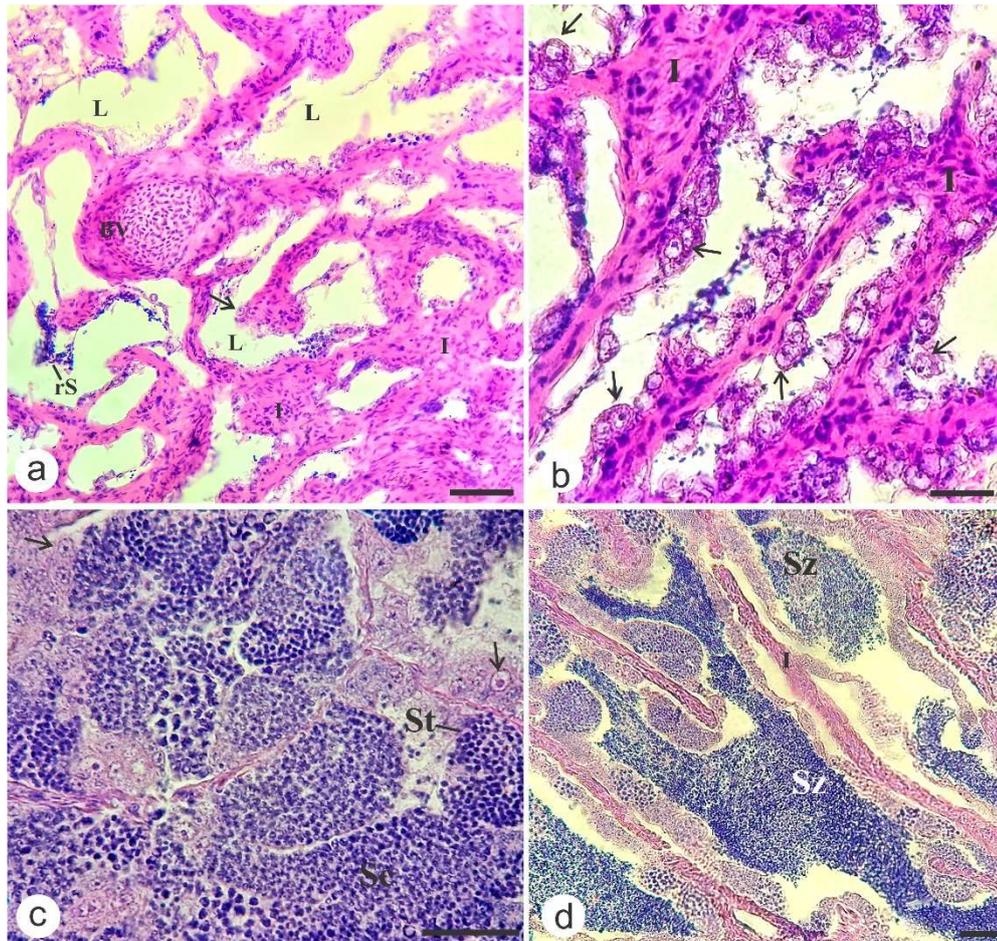


Figura 6. Morfologia dos testículos (após coleta do sêmen) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após uma segunda reprodução induzida e manutenção por 42 dias em sistema com troca parcial de água (PWR; a-b) e em tecnologia de bioflocos (BFT; c-d). a) Testículo espermiado, caracterizado pela presença de espermatozoides residuais (rSz), interstício (I) e Lúmen vazio (L) proeminentes; b) Testículo em regeneração, evidenciado pela proliferação espermatogonial (setas); c) Testículo em Desenvolvimento, com grande volume de cistos espermatogênicos (Sc: espermatócitos; St: espermátides); d) Testículo Apto a espermiação com grande volume de espermatozoides (SZ), no lúmen. Abreviações: BV: Vasos sanguíneos. Barras de escala: a = 100 mm; b-d = 50 mm. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

Em relação à análise estereológica dos testículos, os reprodutores em BFT apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) número de espermatogônias, interstício e lúmen visíveis quando comparados aos reprodutores do sistema PWR. A quantidade de células nos estágios de espermatócito e espermátide nos testículos de machos de *P. mesopotamicus* foi maior para os peixes mantidos em BFT ( $p < 0,05$ ), bem como o

número de espermatozoides, que não estavam presentes nos animais mantidos em PWR (Tabela 4).

**Tabela 4.** Médias para cada estágio celular obtidas a partir da análise estereológica de testículos espermiados de *Piaractus mesopotamicus* após uma segunda reprodução induzida e 42 dias de manutenção em tecnologia de bioflocos (BFT) e sistema de troca parcial de água (PWR).

Estágio celular	Tratamentos			Valor de $P^{(1)}$
	PWR	BFT	CV (%)	
Células no interstício	158,71a	64,34b	3,19	0,003
Células no lúmen	99,10 a	42,62b	7,38	0,009
Espermatogônia	5,91	2,20	54,69	1,000
Espermátide	1,64a	61,80b	17,86	<0,001
Espermatozoide residual	4,04	61,78	124,24	0,120
Espermatozoide	0,00a	37,62b	18,54	<0,001
Espermatócito	158,71a	64,333 b	3,19	0,003

(1) Valor de  $P$  da ANOVA. Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste t de student, ao nível de significância de 5%.

#### 4. Discussão

##### 4.1. Segunda reprodução induzida após manutenção dos reprodutores em BFT e PWR

A manutenção de machos de pacu no sistema em tecnologia de bioflocos (BFT) foi fundamental para alcançar o sucesso reprodutivo com uma nova indução reprodutiva em machos de pacu após um intervalo de 42 dias, com a manutenção do número total de espermatozoides sem comprometer sua qualidade. Esse resultado é especialmente relevante considerando que no sistema com troca parcial de água (PWR) apenas alguns peixes liberaram sêmen. Esses achados corroboram estudos anteriores que sugerem a viabilidade de coletas contínuas de sêmen de peixes neotropicais, como evidenciado por Kuradomi et al. (2015), Pires et al. (2018) e Spica et al. (2021).

Sob determinadas condições, como no uso do BFT, é possível obter um melhor controle sobre a preparação dos reprodutores, provavelmente devido aos benefícios nutricionais (Crab et al., 2007; Avnimelech e Kochba, 2009) e ao controle de qualidade da água proporcionado pela presença de bioflocos (Kumar et al., 2018). Pesquisas recentes têm investigado e reportado melhorias no desempenho produtivo em sistema de BFT (Pellegrin et al., 2021; Machado et al., 2021; Sgnaulin et al., 2021; Pires et al., 2022; Braga et al., 2018), mas os efeitos da tecnologia sobre o desempenho reprodutivo na espécie permanecem desconhecidos. Neste estudo, nós evidenciamos que o BFT é fundamental para permitir reproduções sucessivas na mesma estação reprodutiva com manutenção ou melhoria das características qualitativas do sêmen, assim como a aceleração do processo de recuperação testicular e espermatogênese, resultando na produção de novos espermatozoides para uma nova reprodução, porém, não há trabalhos com avaliação reprodutiva de pacus em BFT, tampouco com reproduções sucessivas no mesmo período reprodutivo de sendo mantidos nesse sistema.

Os reprodutores mantidos no sistema BFT apresentaram maior percentual de taxa de retorno reprodutivo de 75%, valor muito inferior daqueles observados em sistema convencional. Apesar disso, Kuradomi et al. (2015) relataram taxa de retorno de 83% para machos de *P. mesopotamicus* em PWR (n=6), próximo aos valores obtidos no presente estudo. Diferenças metodológicas para indução reprodutiva entre os estudos podem justificar as diferenças nas taxas de retorno reprodutivo. Os valores encontrados por esse autor foram obtidos através de metodologia distinta de coleta de sêmen induzida através do uso de acetato de buseralina + domperidona em sistema tradicional com renovação de água entre o meio (dezembro) e final (janeiro) do período reprodutivo e com intervalo de 36 dias entre as coletas.

#### 4.2. Características Quantitativas do Sêmen

O conhecimento das características quantitativas do sêmen é fundamental para o desenvolvimento de técnicas de reprodução controlada, como a fertilização artificial, a fim de potencializar o sucesso reprodutivo e a maximização do uso do sêmen de reprodutores de alto valor genético e aumento da produção de alevinos em ambientes controlados. A mensuração do volume de sêmen e a análise da concentração espermática são essenciais para determinar a quantidade necessária de

espermatozoides para a fertilização, otimizando o uso do sêmen e potencializando o sucesso reprodutivo. Observamos que os valores de volume de sêmen e a concentração espermática variam consideravelmente entre os estudos. No presente estudo, a produção de sêmen foi inferior aos valores para sêmen de pacu (em PWR) relatados por Sanches et al. (2011) e Fogli da Silveira et al. (1990), que encontraram concentrações espermáticas de até  $35,0 \times 10^9$  spz/mL e  $28,07 \times 10^9$  spz/mL, respectivamente. Por outro lado, valores mais próximos ao observado no presente estudo foram reportados por Morais et al. (2018) e Spica et al. (2024), com concentrações espermáticas de  $10 \times 10^9$  spz/mL e  $3,71 \times 10^9$  spz/mL para a espécie em condições de PWR. Essas variações podem ter ocorrido devido às diferentes metodologias de indução aplicada nos diferentes estudos (Tabela 4). Outros fatores importantes também são responsáveis em influenciar as características quantitativas do sêmen como nutrição, fator de condição corporal e idade do animal.

Tabela 4. Comparativo entre os valores encontrados para volume e concentração espermática do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* coletado sob condições variadas de peso, período reprodutivo e posologia hormonal.

Fonte	Peso (kg)	Período Reprodutivo	Posologia (mg EHC/kg)	Volume (mL)	Concentração ( $\times 10^9$ spz/mL)
Morais et al. (2018)	4,2 ± 1,3	-	3	2,0 ± 0,6	10
Maria et al. (2003)	3,6 ± 0,19	-	0,3 e 3,0	-	13,89 ± 1,26
Silveira et al. (1990)	-	janeiro	-	5 ± 2,8	28,07 ± 8,20
Miliorini et al. (2002)	-	-	-	-	18,62 ± 3,31
Spica et al. (2024)	2,3 ± 0,44	dezembro	5,0	-	3,71 ± 2,87
Sanches et al. (2011)	-	dezembro	2,5	13,6 ± 6,8	35,00
Galo et al. (2019)	-	-	2,5	-	21,90 ± 10,11
	1,79 ± 0,15	novembro		3,13 ± 0,48	24,2 ± 2,3
Kuradomi et al. (2015)	1,83 ± 0,15	dezembro	10ug de acetato de buseralina + 5mg de domperidona	4,06 ± 1,01	41,9 ± 4,1
	1,59 ± 0,14	janeiro		5,57 ± 0,42	35,6 ± 3,8
	1,58 ± 0,11	Coleta sucessiva*		4,40 ± 0,73	36,4 ± 0,44
Presente estudo	1,77 ± 0,26	Janeiro a março	2,5	2,32	2,14

\* Animais submetidos à primeira coleta em dezembro e segunda coleta em janeiro com intervalo de 36 dias.

Assim como observado para os pacus mantidos em BFT do presente estudo, Spica et al. (2021) também relataram queda na concentração espermática com manutenção de volume e produção total de espermatozoides de *Leiarius marmoratus* induzidos no início do período reprodutivo e submetidos à coleta sucessiva depois de 10 dias. Pires et al. (2016) observou manutenção de volume e concentração espermática de *Colossoma macropomum* induzidos no início do período reprodutivo com intervalo de 64 dias entre as coletas, assim como Kuradomi et al. (2015) com *Piaractus mesopotamicus* induzidos no final do período reprodutivo com intervalo de 36 dias entre as coletas. Talvez um maior período de recuperação ou ajustes nutricionais poderiam ter favorecido uma maior concentração de espermatozoides. No entanto, a comparação da segunda coleta da PWR e BFT não diferiram e, portanto, sugere que a manutenção dos reprodutores em BFT por 42 dias foi mais adequado ao sistema PWR, principalmente considerando que neste sistema, apenas três peixes espermiaram, o que compromete o poder da análise comparativa entre os dois sistemas aos 42 dias. De qualquer forma, ajustes no BFT podem evidenciar uma melhora na concentração, no volume e, conseqüentemente, na produção total de espermatozoides dos peixes mantidos nesse sistema.

#### 4.3. Características cinéticas do Sêmen

As características cinéticas do sêmen de *P. mesopotamicus* se mantiveram mesmo quando os animais foram submetidos à coleta sucessiva tanto em BFT quanto em PWR. A manutenção dessas características indica que esses animais estão aptos a promoverem altas taxas de fertilização e eclosão, quando a utilização do seu sêmen é aplicada, uma vez que variáveis como taxa de motilidade, velocidade curvilínea e velocidade em linha reta tem altos coeficiente de correlação com taxa de fertilização e eclosão (Gallego et al., 2013; Gallego e Asturiano, 2018). Valores para as velocidades espermáticas superiores aos do presente estudo foram observadas por Souza (2022), possivelmente devido à diferença no sistema de avaliação utilizado (ImageJ versus SCA). Além disso, valores de motilidade total semelhantes foram relatados pelo mesmo autor (95,4%). Na literatura, é possível encontrar valores de motilidade do sêmen de *P. mesopotamicus* inferiores aos do presente estudo, como

relatado por Streit Jr. et al. (2005, 2006a, 2006b), que observaram valores entre 75% e 79,5%, utilizando metodologias de análise subjetivas.

#### 4.4. Integridade da Membrana e Atividade Mitocondrial

A integridade da membrana é a condição estrutural e funcional da membrana plasmática que protege o espermatozoide, afetando de maneira significativa a fertilidade e o êxito reprodutivo (Ikawa et al., 2010). A membrana do espermatozoide é encarregada de identificar e se comunicar com a membrana ovariana durante o processo de fecundação. Se a integridade da membrana estiver comprometida, o espermatozoide (i) pode ter dificuldades em aderir ou penetrar no óvulo, o que pode dificultar ou impedir a fertilização, (ii) pode perder a habilidade de nadar e se deslocar em direção ao óvulo, diminuindo as possibilidades de atingir o local de fertilização (Anifandis et al., 2014; Ikawa et al., 2010). Além disso, espermatozoides com membranas danificadas podem gerar embriões com problemas genéticos ou desenvolvimento prejudicado, o que pode resultar na geração de descendentes inviáveis ou com malformações. De maneira equivalente, a atividade mitocondrial fornece a energia necessária para o movimento dos flagelos do espermatozoide, possibilitando o deslocamento até o óvulo e a fusão do material genético durante o processo de fertilização. Depois de fertilizado, o óvulo possui uma quantidade específica de mitocôndrias herdadas da mãe. A atividade mitocondrial dos espermatozoides é crucial para fornecer a energia necessária para o começo do desenvolvimento embrionário, até que as mitocôndrias paternas possam assumir totalmente a geração de energia.

No presente estudo, foi observado que a submissão de *P. mesopotamicus* a coletas sucessivas não influenciou os valores de integridade de membrana, que se mantiveram tanto quando os reprodutores foram mantidos em BFT, quanto mantidos em PWR, sendo ligeiramente inferiores aos relatados por Sanches et al. (2011), que encontrou 98,65%, através da contagem de células coradas em lâminas em microscópio. Contudo, ao comparar os dois sistemas entre si, foi possível observar que aqueles animais mantidos em BFT apresentaram maior número de células com alto potencial mitocondrial e, complementarmente, maior número de células com membrana celular íntegra combinadas com alto potencial mitocondrial. Não foram

encontrados dados específicos de atividade mitocondrial para pacu ou outras espécies da família Characidae na literatura, porém os resultados encontrados no presente estudo indicam que o BFT, provavelmente por fornecer flocos ricos em proteína bruta e extrato etéreo, possibilitaram o reprodutor a produzir células espermáticas de alta qualidade e com grande reserva energética.

#### *4.5. Análise morfológica, histológica e estereológica do tecido testicular*

O índice gonadosomático (IGS) é uma medida que relaciona o peso das gônadas (órgãos reprodutivos) de um organismo com o seu peso corporal total. Esse índice é frequentemente utilizado como um indicador da maturidade sexual e do estado reprodutivo dos machos (Villacorta-Correa and Saint-Paul, 1999). Oliveira et al. (1997) avaliaram, entre outras características, o índice gonadosomático de machos de *P. mesopotamicus* ao longo do período reprodutivo (sem indução hormonal). Os valores encontrados pelos autores para o mesmo período no qual o presente estudo ocorreu (fevereiro) foi de 0,145%, o que está próximo do valor de IGS encontrado nos animais mantidos em PWR, porém muito abaixo dos valores encontrados nos animais mantidos em BFT. Um valor elevado de IGS indica que (i) o peixe possui gônadas bem desenvolvidas e está apto para a reprodução, e essa informação é especialmente relevante para espécies de peixes que têm uma estação reprodutiva específica e apresentam maturação sincronizada em determinados períodos do ano (Querol, et al., 2002); (ii) o peixe possui gônadas maiores e com maior produção de gametas (espermatozoides), o que pode aumentar a capacidade de fertilização em machos (Lanna et al., 2013) e; (iii) bem-estar, uma vez que IGS anormalmente baixo pode indicar problemas de saúde, estresse ou desnutrição, o que pode afetar negativamente a reprodução dos peixes (Barcellos et al., 2000).

Em nosso estudo pôde-se verificar que o alto valor de IGS dos animais manejados em BFT após 42 dias da primeira coleta seminal, tem relação com a fase de maturação testicular, que se revelou avançada com grande volume de cistos espermatogênicos e novos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos. Comparativamente, os animais mantidos em PWR apresentaram testículo flácidos e reduzidos, com lúmen dos túbulos seminíferos esvaziados, contendo apenas espermatozoides residuais, além de proliferação de espermatogônias, características

estas relacionadas a um período de regressão testicular pós reprodução (Siqueira-Silva et al., 2013).

## **5. Conclusão**

A manutenção de reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em sistema BFT por 42 dias mostrou-se mais adequada para a reprodução induzida em cenários envolvendo coletas sucessivas de sêmen em comparação ao sistema PWR. Esse resultado é atribuído ao maior número de machos que responderam ao protocolo de indução, às melhores características seminais, ao maior índice gonadossomático e à recuperação mais eficiente das células reprodutivas para a segunda reprodução induzida. Além disso, a manutenção dos reprodutores em BFT permitiu uma melhor otimização da água, resultando em maior produção espermática por litro de água consumido. Dessa forma, o sistema BFT não apenas demonstrou maior eficiência em termos de desempenho reprodutivo, mas também reduziu significativamente o consumo de água, tornando-se uma alternativa ecologicamente mais sustentável.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT); e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

## **Conflitos de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

## **Declaração de contribuição de autoria CRediT**

**Louise Nex Spica:** Conceitualização, Metodologia, Software, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Administração do projeto, Visualização, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. **Ruy Corrêa Filho:** Conceitualização,

Metodologia, Software, Supervisão, Validação, Redação – revisão e edição. **Maurício Gustavo Coelho Emerenciano**: Curadoria de dados, Metodologia, Recursos, Software, Supervisão, Redação – revisão e edição. **Diógenes Henrique de Siqueira Silva**: Metodologia, Recursos, Supervisão, Validação, Visualização, Redação – revisão e edição. **Lucas de Oliveira Brasileiro**: Curadoria de dados, Redação – revisão e edição. **Rebeca Maria Sousa**: Curadoria de dados, Análise formal, Validação, Redação – revisão e edição. **Giovanna Rodrigues Stringhetta**: Curadoria de dados, Recursos. **Jany Bernardino Santos Gomes**: Curadoria de dados, Recursos. **Adryadine Almeida da Costa**: Curadoria de dados, Recursos. **Lais Santos Roque**: Curadoria de dados, Recursos. **Sara Ferreira Pedrosa**: Curadoria de dados, Recursos. **Jayme Aparecido Povh**: Conceitualização, Aquisição de financiamento, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Recursos, Supervisão, Validação, Visualização, Redação – revisão e edição.

## Referências

- ANIFANDIS, G.; MESSINI, C.; DAFOPULOS, K.; SOTIRIOU, S.; MESSINIS, I. Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions: opinions relative to in vitro fertilization (IVF). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 7, p. 12972–12997, 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150712972>.
- ARAÚJO, J. et al. Ovopel® and carp pituitary extract as spawning inducers in males of the amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 57, n. 6, p. 882–886, 2014.
- Avnimelech, Y., Kochba, M., 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using 15 N tracing. *Aquaculture* 287, 163–168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>
- BARCELLOS, L. J. G.; SOUSA, S. M. G.; WOEHHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (revisão). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 26, n. 1, p. 99–111, 2000.

BERNARDINO, G.; ALCÂNTARA, R.C.G.; RAMOS, S.M.; SENHORINI, J.A. Nota sobre o híbrido tambacu-tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) fêmea × pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) macho. In: Proceedings of the IV Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, p. 58, Maceió, Brazil, 1990.

BOYD, C. E. Water quality for pond aquaculture. Research and Development Series, n. 43. Auburn: International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1998.

BRAGA, Leandro Carvalho; LOPES, Paulo Rodinei Soares; FORTUNATO, Nathália Datore; LAVACH, Flavia Luiza; SILVA, Paula Gabrielle da Costa Gisler; CÉSAR, João Pedro Trindade; BUENO, Vanuzze Pacheco de Souza; MACHADO, Tatiana Germano Martins. Influência de diferentes densidades de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) submetidos ao sistema de bioflocos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 28., 2018, Goiânia, GO. *Anais do Congresso Brasileiro de Zootecnia*. Goiânia, 2018.

CARDONA, E.; LORGEUX, B.; CHIM, L.; GOGUENHEIM, J.; DELLIOU, H. L.; CAHU, C. Biofloc contribution to antioxidant defence status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*, v. 452, p. 252–262, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.003>.

CARNEIRO, J.A.; CANISSO, I.F.; BANDEIRA, R.S.; et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal Reproduction Science*, v. 192, p. 107-118, 2018.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu *Colossoma mitrei* (Berg, 1895). Jaboticabal: FCAV/Unesp, 1985. 30 p.

CECCARELLI, P.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. Dicas em piscicultura: perguntas e respostas. Botucatu: Santana Gráfica, 2000. 247 p.

CEMTEC-MS (Centro de Monitoramento de Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul). CEMTEC-MS 6 anos de atividades no Estado. 2024. Disponível em: <[www.agraer.ms.gov.br](http://www.agraer.ms.gov.br)>. Acesso em: [10/10/2024].

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p. 49.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>

DE ROOIJ DG, RUSSELL LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2: 776-798.

DETMANN, E.; COSTA E SILVA, L. F.; PALMA, M. N. N.; ROCHA, G. C.; RODRIGUES, J. P. P. Métodos para análise de alimentos - INCT - Ciência Animal. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2021. 350 p.

EBELING, J.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, v. 257, n. 1-4, p. 346-358, jun. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.

EKASARI, J.; RIVANDI, D. R.; FIRDAUSI, A. P.; SURAWIDJAJA, E. H.; ZAIRIN JR., M.; BOSSIER, P.; DE SCHRYVER, P. Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. *Aquaculture*, v. 441, p. 72-77, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.019>.

EKASARI, J.; SUPRAYUDI, M. A.; WIYOTO, W.; HAZANAH, R. F.; LENGARA, G. S.; SULISTIANI, R.; ALKAHFI, M.; ZAIRIN JR., M. Biofloc technology application in African catfish fingerling production: The effects on the reproductive performance of broodstock and the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*, v. 464, p. 349–356, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.013>.

EMERENCIANO, M. et al. Aquacop. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, v. 44, p. 75-85, 2012.

EMERENCIANO, M. G. C.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MIRANDA-BAEZA, A. Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. In: TUTU, H. (Ed.). *Water Quality*. InTech, 2017. p. 91–109.

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; ARÉVALO, M.; GAXIOLA, G. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research*, v. 45, p. 1713–1726, 2014.

FAO. 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation*. Roma: FAO. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cc0461en>.

FOGLI DA SILVEIRA, Washington; KAVAMOTO, Emico Tahira; CESTAROLLI, Marcos Antonio; GODINHO, Heloisa Maria; RAMOS, Sérgio Moreira; SILVEIRA, Alexandre Ninhaus. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 17, 1990, p. 1-13.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 6, p. 820-832, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1071/RD17460>.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture*, v. 416–417, p. 238-243, 5 dez. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.035>.

GALO, J. M.; STREIT-JUNIOR, D. P.; OLIVEIRA, C. A.; POVH, J. P.; FORNARI, D. C.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching, and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 79, p. 438–445, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.182391>.

Haraz, Y. G., Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Mansour, A. M., & Elblehi, S. S.

(2023). Performance of juvenile *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) raised in conventional and biofloc technology systems as influenced by probiotic water supplementation. *Aquaculture*, 566, 739180. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739180>

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 02 dez. 2024.

IKAWA, M.; INOUE, N.; BENHAM, A. M.; OKABE, M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, p. 984–994, 2010. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI41585>.

Khanjani, M. H., Sharifinia, M., & Hajirezaee, S. (2022). Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. *Aquaculture*, 552, 738021.

Kumar V S, Pandey P K, Anand T, Bhuvaneshwari G R, Dhinakaran A, Kumar S. Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive culture system. *Journal of Environmental Management*. 2018 Jun; 215(1): 206-215.

KURADOMI, Rafael Y.; DE SOUZA, Thiago G.; FORESTI, Fausto; SCHULZ, Rüdiger W.; BOGERD, Jan; MOREIRA, Renata G.; FURLAN, Luiz R.; ALMEIDA, Eduardo A.; MASCHIO, Lucilene R.; BATLOUNI, Sergio R. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 2015.

LANNA, L. L.; SOARES, F. A.; SANTOS, T. M.; OLIVEIRA, J. N.; MARQUES-JÚNIOR, A. P. Gonadosomatic index and correlations between testicular dimensions and weight in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) at 60 days old. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 4, p. 955–960, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000400003>.

LEAL MC, CARDOSO ER, NOBREGA RH, BATLOUNI SR, BOGERD J, FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2009. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio*

erio) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. *Biol Reprod.* 81: 177-187.

LIMA, A. F.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G.; BARROSO, R. M. Reprodução, larvicultura e alevinagem de peixes. In: PISCICULTURA DE ÁGUA DOCE: multiplicando conhecimentos. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 301-346.

LIMA, Jéssica Julian Fernandes. Desenvolvimento e desempenho reprodutivo de lambaris (*Astyanax lacustris*) cultivados em sistema de bioflocos e em sistema de recirculação com água clara. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira / Unesp, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/235986>.

MACHADO, Sara Simões; BLATT, Tainara Laise da Silva; BUGLIONE NETO, Celso Carlos; WATANABE, André Luiz; NASCIMENTO, Isalina Ansilieiro; GAGGINI, Thais Schwarz. Hematology and zootechnical performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultured in bioflocs and aquaponics. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 7, n. 7, p. 66555-66571, jul. 2021. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n7-095>.

Mansour, A.T., Esteban, M.Á., 2017. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 64, 202–209. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.025

MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T. LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 1, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000100025>.

MILIORINI, A. B., MURGAS, L. D. S., VIVEIROS, A. T. M., FRANCISCATTO, R. T., SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus*

*mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, 2002, p. 209-211.

MORAIS, R. M.; SOUTO, C. N.; SILVA, L. A. S.; PÁDUA, D. M. C. Concentração espermática e fertilização artificial de ovócitos do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*). *Scientia Agraria Paranaensis – Sci. Agrar. Parana.*, v. 17, n. 1, p. 144-148, jan./mar. 2018.

NGUYEN, Hong Nguyen. Genetic improvement for important farmed aquaculture species with a reference to carp, tilapia and prawns in Asia: achievements, lessons and challenges. *Fish and Fisheries*, v. 17, n. 3, p. 483–506, 2016.

OLIVEIRA, E. G. de; URBINATI, E. C.; SOUZA, V. L.; ROVIERO, D. P. 1997 Concentrações de glicogênio em diferentes tecidos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 24 (n. especial): 89-95.

OLIVEIRA, Elenise Gonçalves de; URBINATI, Elisabeth C.; SOUZA, Valéria L.; ROVIERO, Damares P. Concentrações de glicogênio em diferentes tecidos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, p. 89-95, 1997.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Eds.). *Aqüicultura no Brasil: O Desafio é Crescer*. p. 135-158. SEAP/FAO, 2008.

PELLEGRIN, Lucas; NITZ, Lilian Fiori; PINTO, Daniel de Sá Britto; COPATTI, Carlos Eduardo; WASIELESKY, Wilson; GARCIA, Luciano. Effects of suspended solids in the survival and haematological parameters of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) in a biofloc technology culture system. *Aquaculture Research*, v. 2021, p. 1–9. <http://dx.doi.org/10.1111/are.15575>.

PIRES, Dara Cristina; BEZERRA, Gabriel Artur; WATANABE, André Luiz; BUGLIONE NETO, Celso Carlos; BICUDO, Álvaro José de Almeida; HISANO, Hamilton. Optimal dietary protein level for pacu *Piaractus mesopotamicus* juveniles reared in biofloc system. *Aquaculture*, v. 556, 2022, p. 738274. ISSN 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738274>.

PIRES, L. B.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; SANCHES, E. A.; ROMAGOSA, E.; SILVA, T. G. D.; RECH, S.; STREIT JUNIOR, D. P.; POVH, J. A. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Animal Reproduction Science*, v. 196, p. 138–142, 2018.

PUDNEY J. 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: RUSSELL LD, GRISWOLD MD. (eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press. p612-657

PUDNEY J. 1996. Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD. (eds.). *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press. p98-142.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Gonadal condition factor, hepatosomatic index and recruitment as indicators of reproductive period of *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), Medium Uruguar river basin, South of Brazil. *Série Zoologia*, v. 92, n. 3, p. 79–84, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212002000300008>.

Rosangela Kiyoko Jomori, Dalton José Carneiro, Maria Inez Espagnoli Geraldo Martins, Maria Célia Portella. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture*, Volume 243, Issues 1–4, 2005, Pages 175-183, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.034>.

ROZA DE ABREU, M.; SILVA, L. M. D. J.; FIGUEIREDO-ARIKI, D. G.; SATO, R. T.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. *Aquaculture Research*, v. 52, n. 2, p. 471-483, 2021.

RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. 1990. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. p1-40

SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; PIANA, P. A.; SOUZA, B. E. D.; BOMBARDELLI, R. A. Fertilização artificial de oócitos e ativação de espermatozoides no pacu: efeitos

da proporção espermatozoide: oócito, volume de água e preservação do sêmen in natura. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 40, n. 1, p. 1–6, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>.

Sas – Statistical Analysis System User's guide. Cary: SAS Institute, 2002. 525p. (Version 9.00).

SCHULZ RW, FRANÇA LR, LAREYRE JJ, LE GAC F, CHIARINI-GARCIA H, NOBREGA RH, MIURA T. 2009. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165(3): 390-411.

SGNAULIN, T.; PINHO, S. M.; DURIGON, E. G.; et al. Culture of pacu *Piaractus mesopotamicus* in biofloc technology (BFT): insights on dietary protein sparing and stomach content. *Aquaculture International*, v. 29, p. 2319–2335, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00748-9>.

SIQUEIRA-SILVA, D. H. de; VICENTINI, C. A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: a novel pattern of testicular development. *Neotropical Ichthyology*, v. 11, p. 587-596, 2013.

SOUZA, Ana Regina Seabra de. Protocolo de criopreservação espermática de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando diferentes soluções crioprotetoras. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2022.

SOUZA, F. N.; MARTINS, E. de F. F.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; ABREU, J. S.; PIRES, L. B.; STREIT JUNIOR, D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A. Ovopel® and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Colossoma macropomum* females. *Animal Reproduction Science*, 2018, v. 195, p. 53–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.005>.

SPICA, L. N.; OLIVEIRA, T. S.; SILVA, A. F.; HERÉDIA-RIBAS, C. M.; POVH, J. A.; BATLOUNI, S. R.; SANCHES, E. A. Viability duration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) milt stored under refrigeration. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, e287330, 2024. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.287330>.

SPICA, L. N.; SANCHES, E. A.; STREIT JUNIOR, D. P.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; BRASILEIRO, L. de O.; RODRIGUES, R. B.; KASAI, R. Y. D.; POVH, J. A. Successive seminal collections from *Leiarius marmoratus* during the reproductive period. *Animal Reproduction Science*, v. 234, p. 106852, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106852>

STREIT JR., Danilo Pedro; BENITES, Celso; MORAES, Gentil Vanini de; RIBEIRO, Ricardo Pereira; SAKAGUTI, Eduardo Shigueiro; CALDIERI, Rivail Ferreira. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 3, p. 289-297, jul./set. 2006b.

STREIT JR., Danilo Pedro; MORAES, Gentil Vanini; RIBEIRO, Ricardo Pereira et al. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum. Animal Science*, v. 27, n. 4, p. 439-447, 2005.

STREIT JR., Danilo Pedro; RIBEIRO, Ricardo Pereira; MORAES, Gentil Vanini de; MENDEZ, Lauro Vargas; GALLO, Juliana Minardi; DIGMAYER, Melanie; POVH, Jayme Aparecido. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. *Bioscienc. J.*, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 119-125, set./dez. 2006a.

Torrans, E. L., and B. Ott. 2018. Effect of grading fingerling hybrid catfish (♀ Channel Catfish × ♂ Blue Catfish) on growth, production, feed conversion, and food fish size distribution. *North American Journal of Aquaculture* 80:187–192. <http://dx.doi.org/10.1002/naaq.10024>.

VALANDRO, Janaína Sayuri Imafuku. Desempenho reprodutivo do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) criados em diferentes sistemas fechados de produção. 2023. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Van Doan, H., Lumsangkul, C., Hoseinifar, S. H., Tongsiri, S., Chitmanat, C., Musthafa, M. S., El-Haroun, E., Ringo, E. (2021). Modulation of growth, innate immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture under biofloc system

by supplementing pineapple peel powder and *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 115, 212-220. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.06.008>

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 149–179, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00664-1).

VILELA DAR. 2003. Duração da espermatogênese e proliferação das células de Sertoli em tilápias-nitlóticas (*Oreochromis niloticus*) mantidas em diferentes temperaturas. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p55.

VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. Índices estruturais e maturidade sexual do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) no Amazonas Central, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, n. 4, p. 637–652, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000400013>.

WOYNAROVICH, A.; WOYNAROVICH, E. *Reproducción artificial de las especies colossoma y piaractus: Una guía detallada para la producción de alevinos de gamitana, paco y craña*. Lima: Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero, 1998. 67 p.

Yu, Y. B., Choi, J. H., Lee, J. H., Jo, A. H., Lee, K. M., & Kim, J. H. (2023). Biofloc Technology in Fish Aquaculture: A Review. *Antioxidants*, 12(2), 398. <https://doi.org/10.3390/antiox12020398>

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 5. Ed, 944p. Pearson Prentice Hall, 2010. Nova Jersey.

Zimba, R.D., Sussel, F.R., Oliveira, K.R.B. de, Segura, J.G., Lima, C.G. de, Viegas, E.M.M., 2017. Desempenho reprodutivo de lambaris alimentados com grãos secos de destilaria. *Bol. do Inst. Pesca* 43, 20–34. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p20>

CAPÍTULO IV - Tempo de viabilidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)  
armazenado sob resfriamento.

Artigo publicado

DOI: 10.1590/1519-6984.287330.

Tempo de viabilidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob resfriamento

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar e analisar a qualidade do sêmen de machos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mantidos refrigerado por 24 horas. Foram utilizados seis machos adultos ( $2,365 \pm 0,44$  kg) para coletas, os quais foram induzidos com extrato de hipófise de carpa ( $5,0$  mg/kg de peso corporal em uma única aplicação). A concentração espermática média observada foi de  $3,71 \times 10^{10} \pm 2,87 \times 10^9$  espermatozoides/mL. As taxas de motilidade espermática apresentaram diferenças ( $P < 0,01$ ) ao longo do tempo, com exceção dos valores obtidos para 24 horas após a coleta, onde os valores de motilidade foram maiores ( $P < 0,01$ ) para espermatozoides armazenados em condições de resfriamento. As taxas de sobrevivência das células espermáticas não diferiram ( $P > 0,01$ ) entre 04 e 08 horas após a coleta. Após 16 horas, as células armazenadas em ambiente refrigerado apresentaram integridade superior ( $P < 0,01$ ;  $82,05 \pm 4,23\%$ ) em relação àquelas armazenadas em temperatura ambiente ( $66,98 \pm 6,45\%$ ), permanecendo assim até 24 horas após a coleta. Para a taxa de morfologia espermática, observou-se que as amostras mantidas sob refrigeração e em temperatura ambiente ainda se mostraram viáveis para utilização ( $P > 0,01$ ) até 08 horas após a coleta; após 16 horas de armazenamento, ambos os tratamentos apresentaram grande redução nas taxas de normalidade ( $P < 0,01$ ); e 24 horas após a coleta, ambos se mostraram inviáveis. Conclui-se que o sêmen de *P. mesopotamicus* pode ser armazenado até 08 horas após a coleta quando mantido refrigerado a até  $12,63$  °C, sem o uso de diluentes e/ou crioprotetores, com garantia mínima de 83% de integridade de membrana, 36% de normalidade de espermatozoides e 51% de motilidade.

**Keywords:** Carp pituitary homogenate; Chilled milt; Computer-assisted sperm analysis; Fish reproduction; Rheophilic fish; Successive seminal collections

Viability time of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) milt stored under cold conditions

**ABSTRACT**

The aim of this study was to verify and analyze the milt quality of male pacu (*Piaractus mesopotamicus*) kept refrigerated over 24 hours. Six adult males ( $2.365 \pm 0.44$  kg) were used for collections, and were induced with carp pituitary extract (5.0 mg/kg of body weight in a single application). The average sperm concentration observed was  $3.71 \times 10^{10} \pm 2.87 \times 10^9$  spermatozoa/mL. Sperm motility rates showed differences ( $P < 0.01$ ) over time, with the exception of values obtained for 24 hours after collection, where motility values were higher ( $P < 0.01$ ) for spermatozoa stored under cold conditions. Spermatozoa straightness showed a decrease ( $P < 0.01$ ) only after 16 hours of storage. Sperm cell survival rates did not differ ( $P > 0.01$ ) between 04 and 08 hours after collection. After 16 hours, cells stored in a refrigerated environment showed superior integrity ( $P < 0.01$ ) ( $82.05 \pm 4.23\%$ ) compared to those stored at room temperature ( $66.98 \pm 6.45\%$ ), remaining so up to 24 hours after collection. For the sperm morphology rate, it was observed that the material kept under refrigeration or at room temperature was still viable for use ( $P > 0.01$ ) up to 08 hours after collection; after 16 hours of storage, both showed a large reduction in normality rates ( $P < 0.01$ ); and 24 hours after collection, both were unfeasible. In conclusion, *P. mesopotamicus* milt can be stored up to 08 hours after collection when kept refrigerated at up to  $12.63$  °C, without the use of extenders and/or cryoprotectants, with a minimum guarantee of 83% of membrane integrity, 36% normal spermatozoa and 51% motility.

**Keywords:** Carp pituitary homogenate; Chilled milt; Computer-assisted sperm analysis; Fish reproduction; Rheophilic fish; Successive seminal collections

## 1. Introdução

A refrigeração para conservação do sêmen de peixes é uma técnica aplicada há tempos para aumentar o tempo de viabilidade espermática por um curto período (horas ou dias) sem a necessidade de congelamento através da técnica de criopreservação, que é mais custosa e geralmente apresenta baixa eficiência na conservação (Oliveira et al., 2007). O resfriamento é uma técnica simples e tem como objetivo solucionar problemas de sincronismo entre machos e fêmeas no momento da desova e também otimizar os trabalhos de reprodução induzida em laboratório e em campo (Ninhaus-Silveira et al., 2002; Horváth et al., 2003; Marques & Godinho, 2004; Linhart et al., 2005).

A conservação do sêmen por meio desta técnica pode ser explicada pela redução da atividade metabólica dos espermatozoides a temperaturas abaixo da fisiológica (Sanches et al., 2011; Cerqueira, 2011), viabilizando a utilização dos espermatozoides por horas e, para algumas espécies até dias, como piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Murgas et al., 2004) e pirapitinga (*Brycon nattereri*) (Oliveira et al., 2007). Alguns trabalhos também testaram diluidores no momento da refrigeração objetivando melhorar a eficiência de proteção das células espermáticas e assim asseguraram maior tempo de viabilidade para fertilização, como por exemplo para *Colossoma macropomum* (Pastrana, 2015), *B. orbignyanus* (Murgas, et al., 2004), *Mugil liza* (Magnotti et al., 2018), *Lutjanus analis* (Sanches et al., 2010; Cerqueira et al., 2011), entre outros.

O modelo biológico utilizado no presente estudo é o pacu, peixe teleósteo neotropical pertencente aos Characiformes, endêmico da Bacia do Prata (Flores Nava 2007; FAO 2010). A espécie é reofilica, portanto possui época definida para reprodução realizando desova total no período compreendido entre os meses de outubro a dezembro, porém é mais acentuada em novembro, onde as condições ambientais favorecem sua desova natural e possibilitam maior sobrevivência das larvas (Bernardino et al., 1998; Urbinati e Gonçalves, 2005). Em ambiente de criação, *P. mesopotamicus* é impossibilitado de realizar migrações reprodutivas, sendo necessário a indução hormonal para que as fêmeas completem a maturação dos gametas e se reproduza. Por ser um modelo biológico amplamente distribuído na América do Sul, o sêmen de *P. mesopotamicus* vem sendo objeto de estudo amplamente explorado, desde avaliação de diferentes diluentes para resfriamento (Streit Jr. et al., 2007) e

criopreservação (Streit Jr. et al., 2006; Teodozia et al., 2020), diferentes metodologias de criopreservação (Paulino et al., 2012; Salmito-Vanderley et al., 2012) até comparações de qualidade de sêmen fresco e sêmen criopreservado (Streit Jr. et al., 2009). Porém, ainda não há trabalhos acompanhando e comparando a curva de qualidade espermática de sêmen fresco e sêmen refrigerado de *P. mesopotamicus* ao longo de 24 horas, que é uma metodologia de suma importância para produtores que não tem acesso a protocolos robustos de criopreservação.

Apesar da indução hormonal ser um processo controlado, algumas variáveis são de difícil controle, como o sincronismo de machos e fêmeas no momento da desova. Além disso, quanto a técnica, diferentes aspectos como temperatura de armazenamento, velocidades de resfriamento devem ser considerados e avaliados para as demais espécies devido às suas distintas particularidades. Assim, a aplicação da técnica do resfriamento para conservação do sêmen é uma alternativa, contudo ainda pouco estudada para o pacu. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade do sêmen de *P. mesopotamicus* em diferentes tempos quando armazenado sob refrigeração ou temperatura ambiente, sem a utilização de diluidores.

## **2. Material e Métodos**

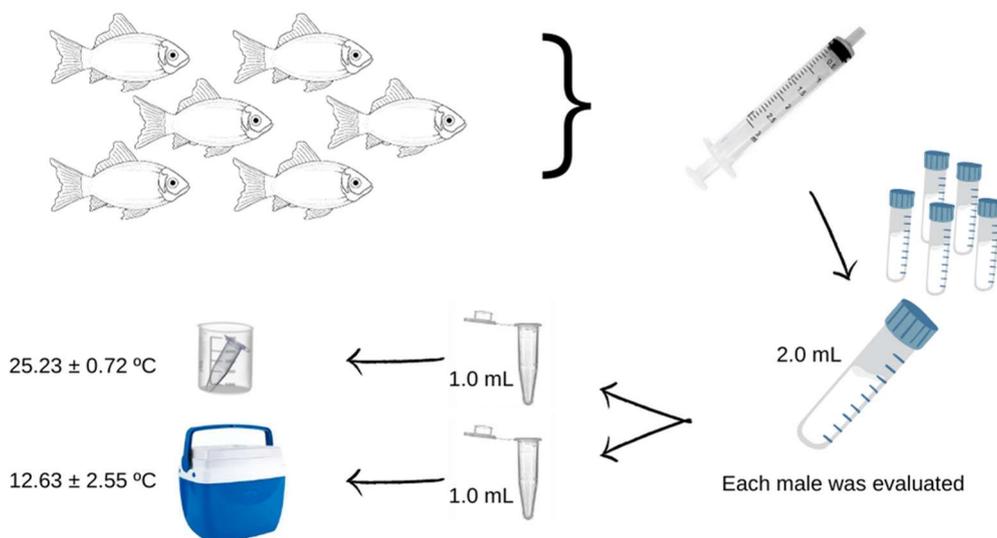
### *2.1. Local, peixes e manejo reprodutivo*

Foram utilizados seis machos adultos de *P. mesopotamicus* com peso de  $2,365 \pm 0,44$  kg para coleta de material espermático no Laboratório de Aquicultura da UNESP, Registro, São Paulo, Brasil. A metodologia utilizada no presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (approval No. 01/2021).

Os peixes foram acondicionados em uma única caixa de polietileno (750 L). Para o tratamento hormonal, os peixes receberam injeções intraperitoneais de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) (dose única de 5 mg/kg de peso vivo) segundo o protocolo adaptado de Araújo et al. (2019) após serem anestesiados com eugenol (50 mg/L) e pesados. Após 240 horas-grau ( $\sim 27^{\circ}\text{C}$ ), realizou-se a extrusão através de massagem abdominal na direção céfalo-caudal.

## 2.2. Design Experimental

Foram coletadas amostras de 2 mL de sêmen dos seis machos. Em seguida estas amostras de sêmen foram separadas em duas alíquotas de 1 mL e transferidas para dois microtubos de 1,5 mL cada. Um microtubo de sêmen de cada macho foi armazenado sob refrigeração em caixa térmica contendo gelo ( $12,63 \pm 2,55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), e outro microtubo armazenado em temperatura ambiente ( $25,23 \pm 0,72 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Figura 1). O acompanhamento dos parâmetros seminais ocorreu nos tempos 04, 08, 16 e 24 horas após coleta, considerando como controle a coleta inicial (0h). Foi determinada a concentração espermática para cada um dos peixes.



**Figura 1.** Desenho experimental para a distribuição do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* nos tratamentos em temperatura ambiente ( $25,23 \pm 0,72 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e sob refrigeração em caixa térmica ( $12,63 \pm 2,55 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## 2.3. Variáveis analisadas

Ao longo dos tempos foram realizadas análises computadorizadas através do software CASA. Também foram feitas amostragens para as análises de taxa de sobrevivência (integridade da membrana) e taxa de espermatozoides normais.

### 2.3.1. Concentração espermática

A concentração média de sêmen de pacu observada no presente trabalho foi de  $3,71 \pm 2,87 \times 10^9$  espermatozoides/mL. Para mensuração da concentração espermática foi diluído 5  $\mu$ L de sêmen em 5.000  $\mu$ L de formol salino tamponado (1:1.000) a 4,6% e para a contagem de células, foi utilizada câmara hematimétrica de Neubauer, conforme Sanches et al., (2011). O valor foi calculado conforme recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para sêmen de mamíferos.

### 2.3.2. Análise seminal computadorizada (CASA, ImageJ)

Para a ativação dos espermatozoides, utilizou-se 5  $\mu$ L de sêmen e 100  $\mu$ L de água destilada (proporção de 1:20 para sêmen:água), em microtubos de 1,5 mL. Logo após a ativação, uma alíquota da solução sêmen e água destilada foi adicionada em câmara de Neubauer espelhada (0,1 mm profundidade), coberta por lamínula de vidro (24 x 24 mm). A câmara foi imediatamente levada ao microscópio de luz trinocular (Solarist Bel) previamente focado em objetiva de 10x acoplado com uma câmera Basler acA640-120gc, conectada ao computador (intel core i7© CPU 2,4 GHz, 8 Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows 8©. Concomitante a ativação espermática, iniciou-se o processo de gravação dos vídeos por meio do software pylon (<http://www.baslerweb.com>) até 60 segundos (tempo necessário para a perda da motilidade de todos os espermatozoides). Os vídeos foram salvos em diretório específico e em seguida processados conforme descrição de Wilson-Leedy e Ingermann (2007) utilizando-se o plugin CASA (Wilson-Leedy e Ingermann, 2006) por meio do software de código aberto ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para tanto, utilizou-se configurações adaptadas para peixes neotropicais brasileiros (Sanches et al., 2010; 2013; Neumann et al., 2013).

Usando o plugin CASA, foi possível avaliar a taxa de motilidade espermática (MOT, %; relação entre espermatozóides considerados móveis e o número total de espermatozóides no campo de visão), velocidade média de deslocamento (VAP,  $\mu$ m/s; velocidade calculada levando em conta o deslocamento médio entre os pontos individuais da trajetória total do esperma), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s; velocidade da célula ao longo do caminho

real), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade calculada a partir do deslocamento representado por a linha reta entre o ponto inicial e o ponto final da trajetória), frequência de batimento transposto (BCF, Hz; número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruzou a direção do movimento), retilinearidade (STR, %; relação percentual de VSL/VAP divisão), oscilação (WOB, %; oscilação entre a trajetória real e a trajetória média, calculada a partir da razão percentual de VAP/VCL) e progressão (PROG) (Verstegen et al., 2002).

### *2.3.3. Integridade de membrana*

A análise da integridade da membrana dos espermatozoides foi realizada utilizando o protocolo descrito por Bombardelli et al. (2006). Em microtubos (1,5 mL), foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de sêmen, 100  $\mu\text{L}$  de eosina azul 3% e 100  $\mu\text{L}$  de nigrosina 5%. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi adicionada a uma lâmina para fazer um esfregaço. Após o preparo das lâminas, a amostra foi analisada em microscópio de luz 40x, onde foram avaliadas aproximadamente 600 células em três campos (200 células em cada campo) por lâmina. Células de cor branca foram consideradas como possuindo membranas intactas, e células danificadas foram aquelas que tinham permeabilidade de membrana ao corante eosina-nigrosina (i.e., células coradas de vermelho ou rosa).

### *2.3.4. Morfologia espermática*

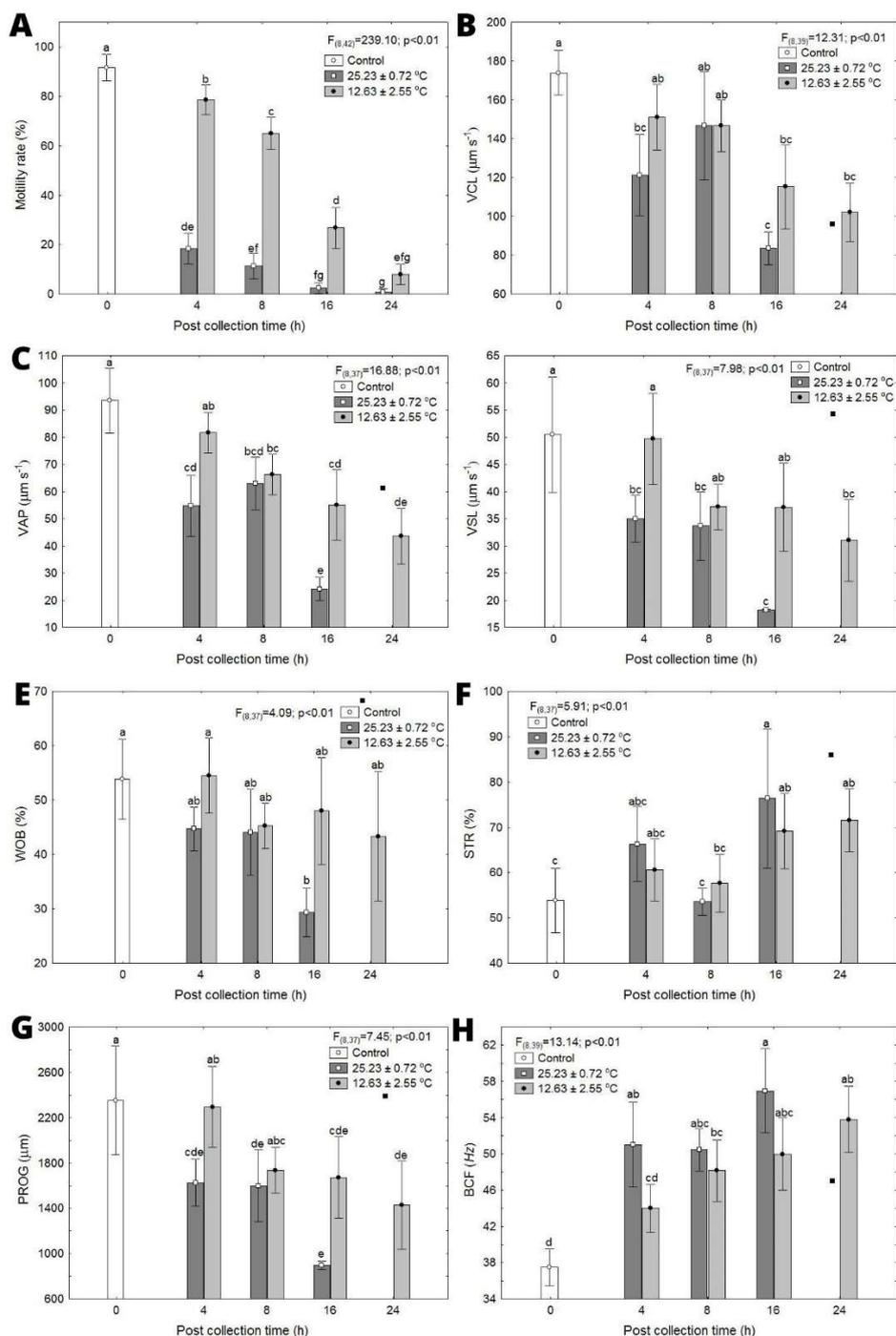
Para analisar a morfologia dos espermatozoides, 10  $\mu\text{L}$  de sêmen, 1.000  $\mu\text{L}$  de formalina tamponada com solução salina 4,6% e 10  $\mu\text{L}$  de corante Rosa Bengala foram adicionados aos microtubos (1,5 mL) (Streit Jr. et al., 2004). Após a homogeneização, duas alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram colocadas nas lâminas em paralelo. As lâminas foram então posicionadas "em pé" em um ângulo de 45° por alguns segundos. Formaram-se assim duas filas de amostras por efeito da gravidade (Sanchez et al., 2016). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz com objetiva de 40x. Aproximadamente 600 células foram contadas em três campos diferentes (200 células em cada campo) por lâmina. Os espermatozóides foram classificados como tendo morfologia típica ou atípica.

#### 2.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos às premissas de normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Outliers pelos testes de Cook acima de 0,1 foram removidos. Foi feita análise de variância de um fator (One Way ANOVA) para todos os tratamentos, com comparação de médias pelo teste de Tukey ( $P < 0,01$ ).

### 3. Resultados

Independente da temperatura de armazenamento, o sêmen nos tempos de 4 a 24 horas apresentou diminuição ( $P < 0,01$ ) da taxa de motilidade em relação ao controle (0 h). No entanto, quando o sêmen foi mantido na temperatura menor ( $12,63 \pm 2,55^\circ\text{C} \sim 12,63^\circ\text{C}$ ) a diminuição da taxa de motilidade do sêmen diminui mais lentamente (de  $91,73 \pm 9,13\%$  para  $78,19 \pm 11,73\%$  com 4h;  $65,17 \pm 13,66\%$  com 8h;  $33,86 \pm 16,46\%$  com 16 h; e  $9,36 \pm 5,68\%$  com 24 h), enquanto que quando mantido em temperatura ambiente ( $25,23 \pm 0,72^\circ\text{C}$ ) a redução da taxa de motilidade foi mais acelerada, sendo que com 4h a taxa de motilidade foi de  $25,30 \pm 18,99\%$  e praticamente zero ( $0,81 \pm 1,70$ ) com 24h (Figura 2).



**Figura 2.** Resultados obtidos ao longo do tempo para os parâmetros avaliados pelo CASA para sêmen de pacu armazenado em temperatura ambiente e resfriado. A) Taxa de motilidade (%): taxa de motilidade espermática; B) VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ): velocidade curvilínea; C) VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ): velocidade média de deslocamento; D) VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ): velocidade em linha reta; E) WOB (%): oscilação; F) STR (%): retilinearidade; G) PROG ( $\mu\text{m}$ ): progressão e; H) BCF (Hz): frequência de batimento transposto.

A VCL foi mantida no sêmen resfriado até 8h, enquanto com o sêmen mantido em temperatura ambiente a redução caiu logo após 4h, porém se reestabelecendo com 8h em valores semelhantes ao controle e ao sêmen mantido refrigerado e caindo novamente nos demais tempos. A partir de 16h o sêmen mantido refrigerado manteve melhores valores ( $119,86 \pm 28,67$  para 16h e  $100,51 \pm 22,19$  para 24h) comparativamente ao não refrigerado ( $84,86 \pm 8,79$  para 16h e zero para 24h).

A VAP foi mantida até 4h no tratamento em que o sêmen foi resfriado ( $81,73 \pm 13,06 \mu\text{m/s}$ ) em comparação ao controle ( $93,49 \pm 17,67 \mu\text{m/s}$ ), reduzindo seu valor ao longo do tempo ( $66,32 \pm 13,79 \mu\text{m/s}$  em 8h,  $56,57 \pm 18,48 \mu\text{m/s}$  em 16h e  $43,39 \pm 15,37 \mu\text{m/s}$  em 24h), enquanto o tratamento com sêmen em temperatura ambiente a VAP foi menor ( $P < 0,01$ ) que o controle logo nas primeiras 4 horas de experimento ( $54,92 \pm 20,19 \mu\text{m/s}$ ), apresentando um aumento no valor as 8 horas pós coleta ( $62,97 \pm 16,66 \mu\text{m/s}$ ) e voltando a diminuir para  $27,00 \pm 11,49 \mu\text{m/s}$  as 16h chegando a zero em 24h. Assim como para VCL, a partir de 16 horas pós armazenamento, o sêmen mantido resfriado apresentou melhores valores de VAP ( $61,49 \pm 37,42$ ) comparativamente ao sêmen mantido em temperatura ambiente.

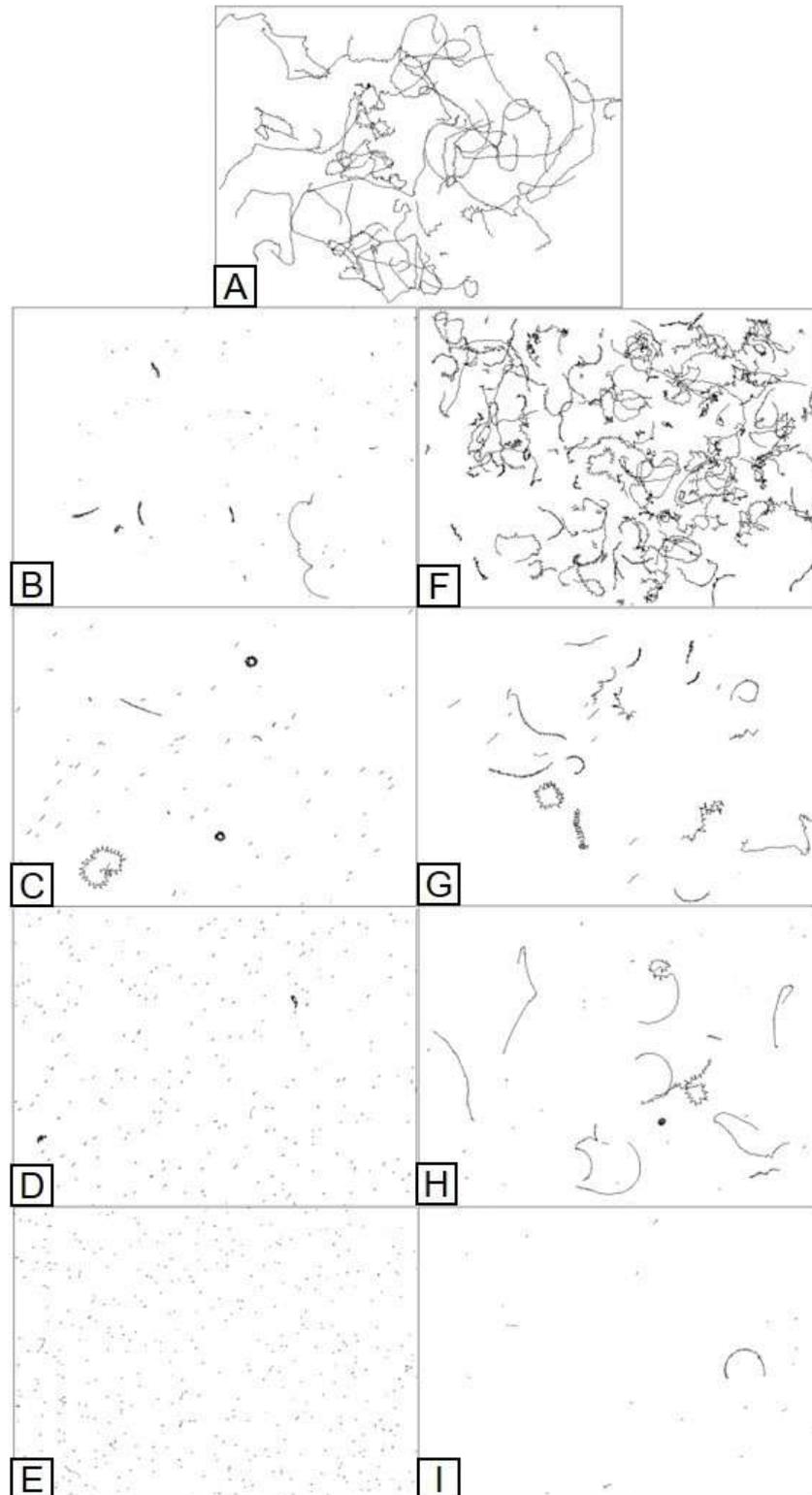
O sêmen manteve VSL constante até 16 horas quando armazenado em ambiente refrigerado, enquanto em temperatura ambiente teve queda no valor logo a partir de 8 horas. Em 16 horas de armazenamento, o sêmen em temperatura ambiente apresentou queda significativa em seu valor quando comparado a 8 horas,  $19,74 \pm 13,25 \mu\text{m/s}$  e  $33,65 \pm 10,89 \mu\text{m/s}$  respectivamente, chegando a zero em 24 horas, enquanto o sêmen refrigerado manteve a VSL em  $31,61 \pm 12,39 \mu\text{m/s}$  mesmo após 24 horas de armazenamento.

Para a oscilação (WOB) verificou-se efeito ( $P < 0,01$ ) apenas após 16h quando o sêmen foi mantido em temperatura ambiente, havendo então uma redução em comparação ao sêmen recém coletado a após 4h da coleta (Figura 2).

Verificou-se que os espermatozoides de *P. mesopotamicus* apresentaram movimentação em trajetórias circulares na medida que se passou o tempo pós-coleta (Figura 3) e com isso, baixos valores ( $P < 0,01$ ) para STR foram evidenciados no sêmen fresco em comparação aqueles mantidos refrigerados em 16h,  $53,82 \pm 9,40\%$  e  $68,97 \pm 19,65\%$  respectivamente. Os espermatozoides

mantidos em temperatura ambiente apresentaram o mesmo comportamento daqueles mantidos refrigerados, com a única exceção de que com 24 horas, o valor de STR caiu para zero.

A PROG teve queda em seus valores ao longo do tempo de avaliação comparativamente ao controle ( $2.352,27 \pm 621,53 \mu\text{m}$ ), porém só diminuiu significativamente ( $P < 0,01$ ) a partir de 16 horas para o sêmen que foi mantido refrigerado ( $1.661,86 \pm 595,07 \mu\text{m}$  em 16 horas e  $1.450,98 \pm 567,61 \mu\text{m}$  em 24 horas) e logo a partir de 4 horas para o sêmen mantido em temperatura ambiente ( $1.623,46 \pm 473,94 \mu\text{m}$  em 4 horas,  $1.599,37 \pm 512,89 \mu\text{m}$  em 8 horas,  $929,26 \pm 566,91 \mu\text{m}$  em 16 horas e zero em 24 horas).



**Figura 3.** Trajetória dos espermatozoides 10 segundos após a ativação. A) controle, tempo 0h; B), C), D) e E) trajetórias dos espermatozoides após 4h, 8h, 16h e 24h de armazenamento em temperatura ambiente, respectivamente; F), G), H) e I) trajetórias dos espermatozoides após 4h, 8h, 16h e 24h de armazenamento refrigerado, respectivamente.

Os valores de BCF se mantiveram constantes nas primeiras 4 horas para o sêmen refrigerado ( $37,52 \pm 4,52$  Hz para o sêmen fresco e  $44,04 \pm 4,56$  Hz em 4h), porém ao longo dos demais tempos avaliados apresentou aumento significativo nos seus valores ( $P < 0,01$ ), onde de  $37,52 \pm 4,52$  Hz no tempo 0h, passou para  $52,79$   $37,52 \pm 4,52$   $8,51$  Hz em 24 horas. Enquanto o sêmen mantido em temperatura ambiente apresentou aumento significativo ( $P < 0,01$ ) nas primeiras 4 horas ( $50,98 \pm 7,42$  Hz) e sem diferença estatística até as 16 horas ( $49,82 \pm 8,05$ ) e caindo para zero as 24 horas pós coleta.

Não houve diferença estatística na comparação das taxas de normalidade espermática entre os dois tratamentos. Porém, ao fazer a comparação das taxas de normalidade de espermatozoides entre os dois tratamentos e o controle (Tempo 0), é possível observar que a taxa de normalidade se manteve estável ( $P > 0,01$ ) até 8 horas para o tratamento com sêmen em temperatura ambiente ( $22,75 \pm 8,15\%$ ) e até 16 horas para o tratamento com sêmen refrigerado ( $33,72 \pm 4,76\%$ ; Figura 4). O sêmen armazenada sob resfriamento só diminuiu ( $P < 0,01$ ) sua taxa de normalidade após 24 horas de armazenamento, enquanto o sêmen mantido em temperatura ambiente diminuiu ( $P < 0,01$ ) sua taxa de normalidade a partir de 16 horas ( $22,75 \pm 8,15\%$ ).

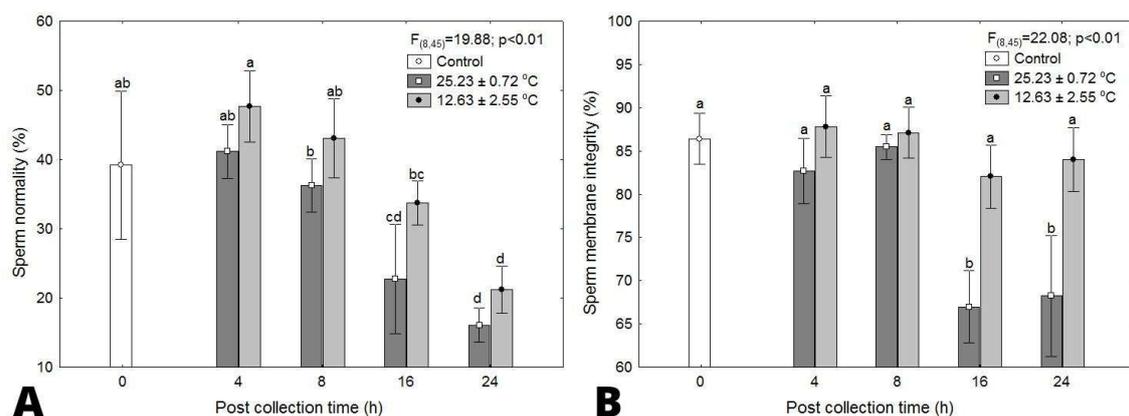


Figura 4. Resultados obtidos ao longo do tempo para: A) taxa de normalidade dos espermatozoides (%) e; B) taxa de integridade da membrana (%); para sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado em temperatura ambiente e sob resfriamento.

Não houve diferença significativa entre os valores de integridade de membrana na comparação para o sêmen em ambiente refrigerado e o controle durante as 24 horas de avaliação. Enquanto o tratamento com sêmen mantido em temperatura ambiente apresentou queda significativa ( $P < 0,01$ ) nos valores de integridade de membrana as 16 horas ( $66,98 \pm 6,45\%$ ) em comparação ao controle ( $86,41 \pm 4,60\%$ ) e manteve os valores estáveis ( $P > 0,01$ ) até as 24 horas de avaliação ( $67,66 \pm 7,64\%$ ).

#### 4. Discussão

O acompanhamento da viabilidade seminal é de importância para o setor produtivo de peixes, concedendo informações como o tempo máximo de possível armazenamento do sêmen. A falta de sincronia da desova e espermição podem causar prejuízos no momento da fertilização dos ovócitos, sendo assim, aplicar técnicas que preservem a viabilidade dos gametas masculinos por maior período de tempo podem auxiliar neste empecilho.

No presente estudo, observamos que o armazenamento em temperatura ambiente afetou negativamente a motilidade espermática do sêmen logo após 4 horas (Figura 2) mesmo os valores médios para o sêmen fresco serem condizentes com aqueles encontrados na literatura por Teodozia, et al. (2020) de 98,7%, da Silva et al. (2022) de 95,3% e Maria et al. (2004) de 95% avaliados através da mesma metodologia com o CASA. Essa observação é de grande importância considerando que a taxa de motilidade espermática tem papel crucial no sucesso da fertilização (Bobe and Labbé, 2010).

As amostras mantidas em temperatura ambiente se apresentaram inviáveis em todos os tempos ( $< 20\%$ ), enquanto as amostras resfriadas, 08 horas após coleta, apresentaram taxas com valores acima de 60%, valores considerados satisfatórios, uma vez que é atribuído como limite para utilização do sêmen, taxa de motilidade espermática de no mínimo 30% para diferentes espécies (Marques e Godinho 2004). Resultados semelhantes foram observados por estes autores para taxas de motilidade espermática de pacu mantido sob refrigeração por até 19h, no qual houve redução constante deste parâmetro ao decorrer das horas. Streit Jr. et al. (2007), avaliaram o resfriamento do sêmen de

pacu ao longo de 120 horas utilizando diferentes diluidores, obtendo assim amostras com 30% de motilidade em até 72 horas de armazenamento.

Pastrana (2015) avaliou sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e constatou 0% de motilidade após 24h de armazenamento sob refrigeração (4°C). No presente trabalho observou-se motilidade de  $9,36 \pm 5,68\%$  após 24h da coleta, abaixo do reportado por Santana (1998), no qual o autor verificou motilidade de 23,75% após 24 horas para sêmen de pacu mantido a 4 °C. Observa-se grande variação dentre as espécies, alguns trabalhos verificaram motilidade por um curto período, como para carpa (*Cyprinus carpio*), no qual verificaram 11h após armazenamento sob refrigeração (Padua et al., 2012). No entanto, para outras espécies como para Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) foi observado motilidade até 144 horas sob refrigeração utilizando BTS como meio diluidor (Murgas et al., 2004). As diferenças encontradas nos valores do presente estudo em relação aqueles encontrados na literatura podem estar associadas com (i) a metodologia aplicada para a redução de temperatura; (ii) particularidades do sêmen das diferentes espécies e; (iii) protocolo e posologia utilizados.

Embora tenha ocorrido uma pequena redução da motilidade com 4 e 8 horas no sêmen refrigerado em relação ao sêmen recém coletado, a refrigeração do sêmen ( $12,63 \pm 2,55^\circ\text{C}$ ) foi efetiva considerando que a manutenção em temperatura ambiente a motilidade caiu drasticamente a partir de 4 horas (<20%). Interessante observar que a motilidade do sêmen resfriado nos tempos 4 e 8 horas tem sido adequado para manter a taxa de fertilização em para tetraodontídeo (*Takifugu niphobles*; Gallego, et al. 2013). A indicação que o sêmen foi adequado até o tempo de 8 horas, embora com uma pequena redução em relação ao tempo zero, é corroborada com a manutenção de outros parâmetros obtidos pelo CASA, tais como VCL (mantido até 8 h), VSL (mantido até 16 h), WOB (mantido até 24 h), e PROG (mantido até 8 h).

Embora a característica VAP tenha sido mantida até 4 horas no sêmen refrigerado, a redução nos demais tempos foi menor ao observado no sêmen mantido em temperatura ambiente, sendo que neste, assim como para as características VSL, WOB, STR, PROG e BCF apenas o sêmen refrigerado apresentava valores para estas variáveis, corroborando que a refrigeração do sêmen proporcionou manutenção parcial das características qualitativas com 16

e 24 horas. Interessante observar os valores das variáveis STR aumentou com 16 h e apenas o sêmen refrigerando se manteve alto (zerou no sêmen mantido em temperatura ambiente); e que BCF aumento no sêmen mantido em temperatura ambiente com 4 e 16 horas (zerando com 24 horas) e com 8 horas no sêmen mantido refrigerado e mantendo este aumento com 24 horas.

Quanto a taxa de normalidade dos espermatozoides, o aumento da porcentagem de decapitação observado no tempo pode, possivelmente, comprometer a viabilidade do sêmen no momento da fertilização. Considerando que a fertilização é realizada a seco (adição do sêmen aos ovócitos sem a presença de água), taxas de integridade de membrana espermática e normalidade dos espermatozoides podem ter maiores influências na viabilidade seminal, até mais do que índices como a própria taxa de motilidade. Observamos baixos valores de motilidade 16 horas após a coleta, no entanto, constatamos bons resultados referentes às taxas de sobrevivência e normalidade espermáticas. Desse modo, pode-se considerar o sêmen viável. Sob refrigeração, 24 horas após a coleta, detectamos grande presença de espermatozoides decapitados, tal caracterização pode apresentar efeito negativo no momento da fertilização, somando ainda a baixa motilidade ( $9,36 \pm 5,68 \%$ ).

As taxas de integridade de membrana estão relacionadas com a integridade de membrana das células, danos verificados na membrana influem negativamente na taxa de sobrevivência. Observou-se que ao longo do tempo esses valores foram decaindo e, de acordo com Pérez-Cerezales et al. (2010) uma pequena porcentagem de espermatozoides com defeitos podem fertilizar ovócitos promovendo uma queda na taxa de eclosão e ocasionar problemas no desenvolvimento inicial dos ovos.

Lima et al. (1989) reportaram bons resultados após o armazenamento de sêmen de *P. mesopotamicus* por 30h em geladeira doméstica, contudo os valores de motilidade não foram informados pelos autores. No presente estudo, foram observados declínios dos parâmetros avaliados após as 16 horas de armazenamento, portanto, recomenda-se o armazenamento sob refrigeração 08h após a coleta, sem a utilização de diluidores.

A principal anormalidade observada 08h após a coleta foram os defeitos de cauda, sendo, cauda curta e dobrada (Figura 5). Após às 16h, foi observado

aumento da presença de espermatozoides com cabeça solta, além dos defeitos de cauda mencionados, pode-se observar tal anormalidade pelo grande número de caudas e cabeças isoladas ao longo das lâminas.



Figura 5. Lâmina de morfologia representando algumas das anormalidades mais comuns encontradas nas amostras. A) Presença de gota na região proximal da cauda; B) Espermatozoides com cauda curta; C) Cauda curvada na região proximal; D) Cauda curvada na região média e; E) Cauda curvada na região distal. Corante: Rosa Bengala. Ampliação: 40x.

## 5. Conclusão

O sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pode ser armazenado até 08 horas após a coleta quando mantido sob refrigeração 12,63°C sem a utilização de diluidores e/ou crioprotetores.

### Declaração de contribuição de autoria CRediT

Louise Nex Spica: Conceitualização, Metodologia, Software, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Administração do projeto, Visualização, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Thais da Silva Oliveira: Conceitualização, Metodologia, Software, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Administração do projeto, Visualização, Redação –

rascunho original, Redação – revisão e edição. Allana Feitoza da Silva: Conceitualização, Curadoria de dados, Investigação, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Cláudia Maria Herédia Ribas: Conceitualização, Curadoria de dados, Investigação, Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição. Jayme Aparecido Povh: Aquisição de financiamento, Recursos, Supervisão, Validação, Redação – revisão e edição. Sérgio Ricardo Batlouni: Análise formal, Validação, Redação – revisão e edição. Eduardo Antônio Sanches: Conceitualização, Aquisição de financiamento, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Recursos, Supervisão, Validação, Visualização, Redação – revisão e edição.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (CAPES) Código de Financiamento 001, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

### **Referências**

- Araújo, J., Streit Jr., D.P., Ribeiro, J.S., Martins, E.F., Souza, F.N., Oliveira, C.A., Ricardo, P.R., Lopera-Barrero, N.M., Povh, J.A., 2014. Ovopel and carp pituitary extract as spawning inducers in males of the amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57(6), 882-886. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402469>
- Blom, E. A., 1950. One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertil. Steril.* 1(2), 176-177. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)30125-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)30125-X)
- Bernardino, G., Alcantara, R. C. G., Senhorini, J. A., 1988. Procedimentos para a reprodução induzida e alevinagem do tambaqui *Colossoma macropomum* e pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Anais do 5º Simpósio Brasileiro de Aquicultura, Aquaciência*, 1251-1257, Santa Catarina, Brasil.
- Bobé, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 535-548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>

- Bombardelli, R. A., Mörschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A., Syperreck, M. A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhandia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). R. Bras. Zootec. 35(4), 1251-1257. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500001>
- Colégio brasileiro de reprodução animal (CBRA), 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2<sup>nd</sup> ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- FAO, 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, FAO. 197p.
- Nava, A. F., 2007. Aquaculture seed resources in Latin America: a regional synthesis, in: Bondad-Reantaso, M. G. (ed.), Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 501, Roma, pp. 91-102.
- Lima, J. A. F., Castagnolli, N., Figueiredo, G. M., 1989. Reprodução, larvicultura e genética. In: Hernandez, A. (Ed.), Cultivo de Colossoma. Bogotá: Red Regional de Entidades y Centros de Acuicultura de America Latina, Colômbia, pp. 315-332.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B., 2004. Reprodução animal, seventh ed. Barueri, São Paulo.
- Horváth, A., Miskolczi, E., Urbánvi, B., 2003. Cryopreservation of comon carp sperm. Aquat. Living Resour. 16(5), 457-460. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(03\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(03)00084-6)
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2021. Produção da Pecuária Nacional. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>. Acesso em: 28 June 2022.
- Linhart, O, Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D., Kocour, M., 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. Cryobiology 51(3), 250-261. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.005>
- Magnotti, C. C. F., Castro, J. J. P., Pedrotti, F. S., Sterzelecki, C. C. F., Sanches, E. G., Cerqueira, V. R., 2019. Short-term storage of lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) sem *in natura* and diluted with CF-HBSS. Acta sci. anim. Sci. 40(1). 39563. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.39563>
- Maria, A.N., Murgas, L.D.S., Silva, M.O.B., Miliorini, A.B., Franciscatto, R.T.,

- Logato, P.V.R., 2004. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). Cien. Agrotec. 28, 191-194.
- Marques, S., Godinho, H. P., 2004. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. Reprod. Biol. 12(2), 231-246. [https://doi.org/10.1016/s1642-431x\(12\)60088-6](https://doi.org/10.1016/s1642-431x(12)60088-6)
- Murgas, L. D. S., Franciscatto, R. T., Santos, A. G. O., 2003. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba, (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). Rev. Bras. Zoot., 32(6), 1810-1814. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000800002>.
- Murgas, L. D. S., Miliorini, A. B., Franciscatto, R. T., Maria, A. N., 2004. Viabilidade espermática do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. Ver. Bras. Zootec., 33(6), 1361-1365. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000600001>.
- Neumann, G., Bombardelli, R. A., Rebecchi de Toledo, C. P., Sanches, E. A., 2013. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre. The Authors, Toledo, PR.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Tabata, Y. A., Rigolino, M., Veríssimo-Silveira, R., 2002. Cryopreservation of rainbow trout semen: Diluent, straw and the vapor column. B. Inst. Pesca, 28(2), 135-139.
- Oliveira, A. V., Viveiros, A. T. M., Maria, A. M., Freitas, R. T. F., Izaú, Z. A., 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59(6), 1509-1515. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600025>.
- Padua, N. H., Shimoda, E., Barbosa, P. S., Pereira Junior, G., 2012. Conservação do sêmen de carpa comum, *Cyprinus carpio*, variedade ornamental, por resfriamento. Acta Biomed. Brasil., 3(1), 63-72.
- Pastrana, Y. M., 2015. Formulação de um diluidor para conservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Nilton Lins University and National Institute for Research in the Amazon, Dissertation, 45p.
- Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., Herráez, M. P., 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. Theriogenology, 74,

- 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.012>.
- Sanches, E. G., Cerqueira, V. R., 2011. Preservação de sêmen refrigerado de Cioba com diluentes e atmosfera modificada. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46(12), 1673-1680. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001200013>.
- Sanches, E. G., Cerqueira, V. R., 2010. Refrigeração do sêmen de Ariocó *Lutjanus synagris*. *B. Inst. Pesca*, 36(4), 293-305.
- Sanches, E. A., Bombardelli, R. A., Marcos, R. M., Neumann, G., Rebechi de Toledo, C. P., Romagosa, E., 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquac. Res.*, 42, 153-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02598.x>.
- Sanches, E. A., Baggio, D. M., Piana, P. A., Souza, B. E., Bombardelli, R. A., 2011. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *Rev. Bras. Zootec.*, 40, 1-6. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>.
- Sanches, E. A., Caneppele, D., Okawara, R. Y., Damasceno, D. Z., Bombardelli, R. A., Romagosa, E., 2016. Inseminating dose and water volume applied to the artificial fertilization of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae): Brazilian endangered fish. *Neotrop. Ichthyol.*, 14(1), 140-158. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140158>.
- Santana, G. M., 1998. Avaliação do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após 6, 18 e 24 horas de resfriamento à temperatura de 4°C. In: Congresso de Iniciação Científica da UFLA CICESAL, 9., Lavras. Abstracts.
- Silveira, W. F. F., Kavamoto, E. T., Cestarelli, M. A., Godinho, H. M., Ramos, S. M., Silveira, A. N., 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), proveniente da reprodução induzida. *Inst. Biol. Pesca*, 17, 1-13. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>
- Streit Jr., D. P., Ribeiro, R. P., Moraes, G. V., Vargas, L. D. M., Digmayer, M., Galo, J. M., Povh, J. A., Braccini Neto, B., 2007. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores. *Rev. Biociênc.*, 13(3-4), 178-187. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140158>
- Urbinati, E.C., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In:

- Baldisseroto, B., Gomes, L. C. (Eds.), Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Editora UFSM, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L, 2006. Manual for CASA plugin for Image J. <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/docs/CASAIstructions.pdf> (accessed 29 June 2022).
- Streit Jr., D. P., Benites, C., de Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Sakaguti, E. S., Caldieri, R. F., 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. Ciênc. Anim. Bras., 7(3), 289-297.
- Streit Jr., D. P., de Oliveira, A. C., Ribeiro, R. P., Sirol, R. N., de Moraes, G. V., Galo, J. M., Digmayer, M., 2009. Motility, Vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. B. Inst. Pesca, 35(2), 159-167.
- Teodozia, E. R. P., Araújo, M. S. O., Lopes, J. T., Montenegro, A. R., Salmito-Vanderley, C. S. B., 2020. Criopreservação seminal de *Piaractus mesopotamicus*: efeito de diferentes diluentes e equipamentos de congelação. Rev. Ciênc. Agron., 51(2), e20196754. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039>.
- Salmito-Vanderley, C. S. B., Vieira, M. J. A. F., Leite, L. V., Oliveira, F. C. E., Linhares, F. R. A., Salgueiro, C. C. M., Nunes, J. F., 2012. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. Ciênc. Anim., 22(1), 255-268.
- Paulino, M. S., Murgas, L. D. S., Felizardo, V. O., Freitas, R. T. F., 2012. Abnormalities of sperm after thawing *Piaractus mesopotamicus* using different methodologies. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 64(6), 1591-1596. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600027>.
- Da Silva, A. R., Coricni, C. D. Alves, F. P., Soares, S. L., Anciutti, A. N., Squeff-Filho, J., Jardim, R. D., Esquivel-Muelbert, J. R., Garcia, J. R. E., Varela Jr., A. S., 2022. Criopreservation of pacu sperm (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1379415/v>.
- Gallego, V., Pérez, L., Asturiano, J. F., Yoshida, M., 2013. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). Aquaculture, 416-417, 238-

243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.035>.