

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

**DIFERENTES TEMPERATURAS E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN**  
**DE LAMBARI-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax lacustris*)**

**PAULA RENATA PERIUS**

**CAMPO GRANDE, MS**

**2024**

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

**DIFERENTES TEMPERATURAS E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN  
DE LAMBARI-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax lacustris*)**

Different temperatures and storage periods of yellow-tailed lambari (*Astyanax lacustris*) semen

**Paula Renata Perius**

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

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

**CAMPO GRANDE, MS-2024**



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



**Certificado de aprovação**

PAULA RENATA PERIUS

**DIFERENTES TEMPERATURAS E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN DE LAMBARI-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax lacustris*)**

**DIFFERENT TEMPERATURES AND STORAGE PERIODS OF YELLOW-TAILED LAMBARI (*Astyanax lacustris*) SEMEN**

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

Aprovado em: 30-07-2024

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Jayme Aparecido Povh  
(UFMS) – Presidente

---

Dr. Ruy Alberto Caetano Correa Filho  
(UFMS)

---

Dra. Susana Amaral Teixeira Manso  
(UFMS)

**NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC**

**UFMS  
É 10!!!**



Documento assinado eletronicamente por **Ruy Alberto Caetano Correa Filho, Professor do Magisterio Superior**, em 12/08/2024, às 18:01, 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 **Jayme Aparecido Povh, Professor do Magisterio Superior**, em 13/08/2024, às 13:39, 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 14/08/2024, às 07:36, 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 **5025532** e o código CRC **0FB8F622**.

#### 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 SEI nº 5025532

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdir e Lúcia, por todo o amor, apoio e valores que me transmitiram ao longo da vida. A vocês, que sempre acreditaram em mim e ficaram ao meu lado em todos os momentos,

Às minhas irmãs, Lara e Karina, pelo carinho, incentivo e por serem minhas maiores companheiras nesta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh, por seu constante apoio e orientação. Sua paciência e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também ao Prof. Dr. Ruy Alberto Caetano Correa Filho pela generosa assistência e atenção dispensadas na parte estatística deste estudo. Sua expertise foi essencial para a análise dos dados e para os resultados obtidos.

Estendo meus sinceros agradecimentos a Luana Pires e a Louise Nex Spica pela valiosa ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições foram inestimáveis para a conclusão deste projeto.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) por proporcionar um ambiente acadêmico de excelência, fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também à CAPES pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsas de estudo, essenciais para a continuidade desta pesquisa e para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço de coração aos meus pais, Valdir e Lúcia, e às minhas irmãs, Lara e Karina, pelo amor, incentivo e suporte incondicional ao longo desta jornada.

Aos meus colegas de mestrado, que me acompanham nesta caminhada, minha gratidão por todo o apoio e companheirismo durante o curso.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as características do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) armazenados em diferentes condições de temperatura e tempo. Foram utilizados 20 machos sexualmente maduros. Os peixes foram induzidos à reprodução com 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg. Após 220 horas-grau, o sêmen coletado foi armazenado por até 40 horas em duas temperaturas distintas: temperatura ambiente ( $22,9 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ) e resfriado ( $12,2 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ ). Em cada um destes tratamentos (temperaturas) foi utilizado o peixe como repetição, sendo 10 repetições por temperatura de armazenamento. As características do sêmen foram analisadas a cada 10 horas usando o software CASA/ImageJ. A motilidade espermática (MOT) com 10 e 20 horas foi maior ( $P < 0,05$ ) no sêmen mantido resfriado (78,10%; 60,78%) em relação ao sêmen mantido em temperatura ambiente (39,52%; 14,59%). Apenas o sêmen resfriado apresentou motilidade até 40 horas. Até 20 horas, não houve diferença significativa na velocidade curvilinear (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL) entre o sêmen armazenado em temperatura ambiente e resfriado. Contudo, após 20 horas, apenas o sêmen resfriado apresentou valores para essas variáveis. Em geral, o resfriamento foi eficiente para manter as características do sêmen, principalmente com 30 e 40 horas de armazenamento considerando que apenas nessa condição de armazenamento o sêmen apresentava viabilidade. Conclui-se que o resfriamento do sêmen de *A. lacustris* permite ampliar a viabilidade dos espermatozoides em até 20 horas sem comprometer sua qualidade na maioria das características analisadas, mantendo ainda a capacidade de fertilização até 40 horas de armazenamento, embora com menor qualidade seminal.

**Palavras-chave:** características seminais, conservação gamética, motilidade espermática, reprodução induzida, velocidade seminal.

## Abstract

The objective of this study was to verify if the characteristics of the yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*) semen remain consistent over time when stored under different temperature and time conditions. Twenty sexually mature males were used. The fish were induced to reproduce with 2.5 mg of carp pituitary extract/kg. After 220 degree-hours, the collected semen was stored for up to 40 hours at two different temperatures: room temperature ( $22.9 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ) and cooled ( $12.2 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ ). In each of these treatments (temperatures), the fish were used as repetitions, with 10 repetitions per storage temperature. Semen characteristics were analyzed every 10 hours using CASA/ImageJ software. Sperm motility (MOT) at 10 and 20 hours was higher ( $P < 0.05$ ) in semen kept cooled (78.10%; 60.78%) compared to semen kept at room temperature (39.52%; 14.59%). Only cooled semen showed motility up to 40 hours. Up to 20 hours, there was no significant difference in curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), and straight-line velocity (VSL) between semen stored at room temperature and cooled. However, after 20 hours, only cooled semen showed detectable values for these variables. Overall, cooling was efficient in maintaining semen characteristics, especially at 30 and 40 hours of storage, considering that only in this storage condition did the semen show viability. It is concluded that cooling *A. lacustris* semen allows extending sperm viability up to 20 hours without compromising its quality in most analyzed characteristics, still maintaining fertilization capacity up to 40 hours of storage, although with lower seminal quality.

**Keywords:** seminal characteristics, gamete preservation, sperm motility, induced reproduction, semen velocity

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	10
1. REVISÃO DE LIRATURA.....	12
1.1. LAMBARI-DO-RABO-AMARELO ( <i>Astyanax lacustris</i> ).....	12
2. REPRODUÇÃO.....	13
2.2. CONSERVAÇÃO DE SÊMEN.....	14
2.1. CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN.....	17
2.3. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) .....	17
REFERÊNCIAS.....	20
1. Introdução .....	25
2. Material e métodos.....	26
2.1. Local, animais .....	26
2.2. Indução hormonal.....	26
2.3. Coleta de sêmen .....	26
2.4. Delineamento experimental .....	27
2.5. Características seminais .....	27
2.6. Análise estatística .....	28
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO .....	32
5. CONCLUSÃO .....	34
Agradecimentos .....	34
REFERÊNCIAS.....	34

## INTRODUÇÃO

Atualmente a produção de peixes, obtidos tanto da pesca como da aquicultura, desempenha um papel crucial na garantia da segurança alimentar em todo o mundo (FAO, 2024). A aquicultura tem sido o setor de produção de alimentos que mais cresceu nas últimas cinco décadas, sendo que a produção total de peixes até 2032 chegue a 205 milhões de toneladas, um aumento de 10% em relação a 2022, com a aquicultura representando 111 milhões de toneladas desse total (FAO, 2024). No último ano, a produção de peixes de cultivo no Brasil alcançou 887.029 toneladas, esse valor reflete um crescimento de 3,1% em relação a produção de 2022 (PEIXE BR, 2024).

A conservação de espermatozoides de peixes pode ser aplicada para práticas relacionadas à conservação das espécies e também da aquicultura. A preservação de sêmen a curto prazo mantém a viabilidade por horas ou dias, em temperaturas de resfriamento, isso simplifica o manejo, sem a necessidade da presença do macho durante a fecundação, e aumenta a eficiência da reprodução artificial em pisciculturas (Murgas *et al.*, 2004). O resfriamento do sêmen é uma ferramenta crucial na reprodução de peixes, contribuindo significativamente para o sucesso da propagação artificial de várias espécies (Sanchez & Cerqueira, 2010).

Resultados satisfatório tem sido obtido com resfriamento do sêmen de diferentes espécies Neotropicais Sul-Americanas, tais como *Leiarius marmoratus* por 7 horas em 13°C temperatura (Galo *et al.*, 2014), *Colossoma macropomum* por 35 horas em 16.9°C temperatura (Pires *et al.*, 2019), *Astyanax altiparanae* por 14 dias e 14°C temperatura (Yasui *et al.*, 2015), a ampliação do tempo de conservação do sêmen é importante para algumas práticas importantes de manejo e, nesse sentido, a aplicação de metodologias em espécies de menor porte, como o lambari, proporciona avaliar diferentes protocolos de conservação de gametas com um número adequado de repetições (situação muitas vezes difícil de se conseguir com peixes de maior porte), aumentando a precisão quanto às inferências. Neste sentido, o lambari se enquadra como uma boa espécie modelo de estudos reprodutivos, posteriormente, podem ser testados em outras espécies nativas de grande valor comercial e de grande porte, as quais muitas vezes há limitação de se trabalhar com número adequado de repetições. A revisão abaixo apresenta a situação atual da produção de peixes no

Brasil, evidenciando o lambari, e os dados obtidos até o momento referente às características reprodutivas desta espécie.

## 1. REVISÃO DE LIRATURA

### 1.1. LAMبارI-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax lacustris*)

Os lambaris são membros da subfamília Tetragonopterinae, estão dentro da família Characidae, que engloba a maior parte dos peixes de água doce do país e apresentam uma grande diversidade de espécies, com destaque para a do gênero *Astyanax* (Britski, 1972). As espécies desse gênero apresentam uma distinta mancha umeral preta e outra mancha que se estende desde o pedúnculo caudal até o final dos raios médios da nadadeira caudal (Garuttl & Britski, 2000). Além disso, os peixes, pertencentes a esse gênero apresentam uma grande capacidade de forragear em diferentes níveis tróficos e possuem uma notável habilidade de se adaptar de forma rápida a novas fontes de alimento em resposta às mudanças ambientais (Gomieiro & Braga, 2003).

Nos últimos trinta anos, a prática da produção do lambari, também conhecida como lambaricultura, cresceu como uma fonte de receita alternativa para pequenos produtores na região sudeste do Brasil principalmente para atender às necessidades do mercado de iscas vivas para pesca esportiva (Valladão *et al.*, 2018). *Astyanax lacustris*, conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo (Figura 1), é um peixe nativo com hábito alimentar onívoro e crescimento rápido, sendo que os machos costumam atingir entre 7 a 9 centímetros de comprimento, enquanto as fêmeas podem chegar de 12 a 15 centímetros, e ambos atingem a maturidade sexual por volta dos quatro meses de idade (Baldisserotto, 2009). Nos machos, durante o período reprodutivo, é possível observar espículas na nadadeira anal, conferindo-lhe uma textura áspera ao toque, sendo essa característica importante na seleção de indivíduos para a reprodução induzida, pois quanto mais áspera a nadadeira, mais maduro sexualmente é o macho (Porto-Foresti *et al.*, 2005).

A espécie lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) possui uma alta taxa de fertilidade, facilidade no processo reprodutivo e rápido crescimento, chegando ao peso comercial em cerca de três meses (Garutti, 2003). Devido à sua posição como peixe nativo de baixo nível trófico, os lambaris possuem potencial para serem criados de forma sustentável em pequenas propriedades rurais (Valladão *et al.*, 2016). Esses animais demonstram uma boa adaptação a rações comerciais e também possuem uma alimentação diversificada e são conhecidos por produzirem ovos pequenos e numerosos, os quais se desenvolvem rapidamente (Dias *et al.*, 2005).



Figura 1. Exemplar de macho em idade reprodutiva de *Astyanax lacustris*. (Fonte: Arquivo pessoal).

## 2. REPRODUÇÃO

A elevação de temperatura da água, o aumento do fotoperíodo e das chuvas, estão entre os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento e maturação das gônadas dos peixes. O hipotálamo processa os estímulos ambientais, dando início aos processos hormonais e fisiológicos ligados a reprodução, através da liberação do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) (Kubtiza, 2004b). As gonadotropinas hipofisárias são transportadas via plasma até as gônadas, estimulando a maturação e liberação dos gametas (Baldisserotto, 2013).

As condições em laboratório não estimulam satisfatoriamente à reprodução dos peixes reofílicos e, por essa razão, faz-se necessário a aplicação de indutores para que os peixes completem o ciclo reprodutivo. Atualmente existem uma grande variedade de substâncias que são utilizadas para induzir a desova e a espermição, cada uma possuindo suas particularidades e mecanismos de ação. A dosagem de aplicação varia entre os indutores e peso do animal, alguns são mais eficientes que

outros, mas isso varia de acordo com as espécies (Baldisserotto, 2013; Baldisserotto & Gomes, 2013).

A indução hormonal atua como um estímulo exógeno para a maturação final das gônadas. Nas fêmeas é a maturação e liberação dos ovócitos, nos machos consiste, em geral, facilitar a espermição. O hormônio mais empregado para a indução hormonal em peixes é o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), entretanto há outros tipos de hipófises que podem ser utilizados para indução, como de outros peixes ou de outros e há ainda opções de hormônios sintéticos tais como GnRH, hCG e LH-RH (Streit Júnior *et al.*, 2012, Dalmass *et al.*, 2016), Ovopel e acetato de busserelina (Brasileiro *et al.*, 2023).

Para manipular os reprodutores, é essencial ter cuidado para evitar lesões nos animais, sendo fundamental contar com mão-de-obra qualificada para o sucesso da indução. Em peixes doces, a aplicação pode ser feita na água, com o peixe imobilizado e o abdômen virado para cima. Se for necessário manipular o animal fora da água, devem ser utilizadas superfícies macias, se o peixe estiver agitado pode ser feito o uso de anestésicos como benzocaína ou óleo de cravo (Kubitza, 2004; Streit Júnior *et al.*, 2012; Dalmass *et al.*, 2016). A solução deve ser aplicada rapidamente e com precisão na base da nadadeira peitoral, no sentido cabeça-cauda, para reduzir o risco de perfuração de órgãos, com o peixe de lado e sem o uso agulhas muito finas ou longas (Kubitza, 2004b). Em fêmeas deverão ser feitas duas aplicações com o indutor extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), sendo a primeira utilizando 10% da totalidade da dose e a segunda após aproximadamente 12 horas usando 90% da dose. Nos machos só é feita uma aplicação total que é junto com a segunda aplicação nas fêmeas. A reprodução induzida em peixes reofílicos é crucial para superar as limitações do ambiente laboratorial. O uso de indutores hormonais, como o extrato bruto de hipófise de carpa, facilita a maturação e a liberação dos gametas, garantindo o sucesso reprodutivo.

## 2.2. CONSERVAÇÃO DE SÊMEN

A preservação seminal de peixes desempenha um papel muito importante na conservação dos gametas masculinos, garantindo sua viabilidade para futuras aplicações em fertilização assistida (Salmito-Vanderley, 2016). Entre as técnicas de preservação do sêmen, o resfriamento e a criopreservação se destacam. A técnica de criopreservação possibilita o armazenamento dos gametas em nitrogênio líquido a

uma temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , preservando a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides por tempo indeterminado (Felizardo, 2008). Já o resfriamento do sêmen de peixes é uma prática muito antiga, preservando as características do sêmen por horas ou até mesmo dias possibilitando seu uso no momento ideal para reprodução, sendo uma alternativa mais econômica em comparação com a técnica de congelamento e dispensando a adição de soluções crioprotetoras, possibilitando o resfriamento em uma faixa de temperatura entre  $1$  e  $15^{\circ}\text{C}$  (Leite *et al.*, 2017). A utilização de diluentes no resfriamento do sêmen pode ajudar a diminuir a concorrência dos espermatozoides por oxigênio, espaço e reduzir o crescimento bacteriano (Carolsfeld & Harvey, 1999; Viveiros *et al.*, 2010), porém podem não ser encontrados com facilidade no mercado e dispendiosos em relação ao seu alto custo.

O resfriamento e a criopreservação são utilizados para permitir o uso posterior do sêmen na fertilização, não necessitando da presença do macho durante o ato da fecundação. Além disso, ajudam a aumentar a eficácia da reprodução em pisciculturas (Stoss & Donaldson, 1982). Para se obter sucesso na aplicação do resfriamento é importante ter alguns cuidados, como temperatura adequada, o fornecimento e a troca eficiente de gases, o controle do desenvolvimento bacteriano e a prevenção da desidratação, esses pontos são fundamentais para garantir que o resfriamento seja eficaz (Peñaranda *et al.*, 2010). Também são necessários cuidados específicos durante a coleta, para garantir eficiência na conservação do sêmen e para evitar a ativação dos espermatozoides antes do momento desejado para sua utilização. Na coleta é importante que a papila urogenital esteja completamente seca para prevenir qualquer contaminação por água, urina ou sangue (Poupard *et al.*, 1998).

Os protocolos de resfriamento de sêmen têm se mostrado eficientes em diferentes espécies de peixes. Os trabalhos tem mostrando que é possível manter a qualidade do sêmen no mínimo por cinco horas, como observado por Pires *et al.* (2019) para *Colossoma macropomum* com sêmen resfriado à  $16,9 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ , mas pode chegar até 144 horas, como observado *Epinephelus marginatus* com sêmen armazenado à temperatura  $4^{\circ}\text{C}$  (Tabela 1). Cabe destacar que resultados positivos foram obtidos para algumas espécies Sul Americanas Neotropicais, como *Colossoma macropomum* e *Leiarius marmoratus*, mas em muitas espécies não se validou a eficiência do resfriamento do sêmen, como, por exemplo, no lambari-do-rabo-amarelo (Tabela 1).

Tabela1. Eficácia do Resfriamento de Sêmen de Diferentes Espécies de Peixes diferentes pesquisas.

<b>Espécie</b>	<b>Tempo de Armazenamento resfriado</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Resultados principal</b>	<b>Autor</b>
<i>Colossoma macropomum</i>	35h	16.9 ± 2.1°C	o resfriamento do sêmen permitiu estender a viabilidade dos espermatozoides de 5 a 10 horas sem comprometer a qualidade.	PIRES et al (2019)
<i>Cyprinus carpio</i>	11h	4°C	A conservação do sêmen resfriado permite a manutenção da motilidade em pelo menos 30% e a aplicação prática por até 11,7 horas.	PADUA (2012)
<i>Epinephelus marginatus</i>	12h	4°C	A refrigeração do sêmen é eficiente para a conservação de curto prazo, sendo possível, mediante o emprego de diluentes manter a viabilidade espermática por até 144 horas	SILVA (2018)
<i>Leiarius marmoratus</i>	7h	13 ± 2°C	O sêmen resfriado manteve sua viabilidade por 7 horas enquanto o sêmen em temperatura ambiente com 3 horas já tinha perdido praticamente toda viabilidade.	GALO et al., (2014)
<i>Leiarius marmoratus</i>	28h	16.11 ± 2.20°C	O sêmen resfriado se manteve com boa viabilidade, por 28 horas enquanto o mantido em temperatura ambiente perdeu sua motilidade após 12 horas	LEITE (2021)
<i>Lutjanus analis</i>	12h	4°C	A refrigeração do sêmen com diluentes por até 24 horas, demonstra uma taxa de fertilização semelhante à do sêmen fresco.	SANCHES et al., (2011)
<i>Lutjanus synagris</i>	24h	4°C	utilizando-se diluidores o sêmen foi mantido por até 48 horas com uma boa qualidade espermática.	SANCHES (2010)

## 2.1. CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN

Durante o ciclo reprodutivo, os peixes teleósteos passam por mudanças morfológicas em suas gônadas, que são observadas e utilizadas para identificar os diferentes estágios de maturação gonadal, essas mudanças ocorrem na variação da cor, peso, aspecto e presença de esperma (Baldisserotto *et al.* 2014). A quantidade total de espermatozoides produzidos por um macho está diretamente ligada à sua capacidade reprodutiva, sendo essa avaliação essencial para determinar os protocolos adequados de reprodução artificial. Essa característica permite que o produtor determine a dose inseminante apropriada, aumentando as taxas de fertilização ao final do processo (Sanches *et al.*, 2011).

Os espermatozoides permanecem imóveis enquanto estão nos testículos dos peixes e só se tornam ativos após entrar em contato com uma solução que é hiposmótica em relação ao plasma seminal (Cosson, 2010). Dentro das espécies de peixes, há variações nas características do sêmen, e sua avaliação é crucial para garantir uma reprodução bem-sucedida (Trein, 2018). A fertilização dos ovócitos ocorre somente após a ativação da motilidade dos espermatozoides, desencadeada pelo contato com a água. Geralmente, essa ativação é irreversível e a motilidade é de curta duração. Após o período de ativação, os espermatozoides perdem sua capacidade de fertilizar o ovócito devido à alta velocidade de consumo de suas reservas energéticas, sendo crucial conhecer esse tempo de ativação da espécie a ser trabalhada (Carneiro, 2006). A motilidade espermática, indica a taxa de espermatozoides em movimento, e é o parâmetro mais comum para avaliar a qualidade seminal (Viveiros *et al.*, 2011). As avaliações das características seminais evoluíram nos últimos anos da forma subjetiva para a forma de análise computadorizada, tais como pelo método "Computer Assisted Sperm Analysis", que permite uma rápida estimativa das características espermáticas, utilizando um processo bastante preciso e tecnicado (Gallego *et al.*, 2013).

## 2.3. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é uma ferramenta de software empregado na avaliação do esperma, para visualizar, digitalizar e analisar imagens sequenciais. Uma das vantagens significativas deste sistema é sua capacidade de quantificar um grande número de células com padrões variados em um curto intervalo

de tempo, oferecendo dados precisos e relevantes sobre o movimento individual de cada célula, assim como de subpopulações de espermatozoides (Amann & Katz, 2004; Kraemer *et al.*, 1998). Depois de detectar o espermatozoide, o programa combina as imagens e traça a trajetória de cada célula, o que permite classificar o movimento realizado (Mortimer, 2015). As características seminais são fundamentais para determinar a qualidade reprodutiva dos machos, sendo que atualmente as principais características são: (i) MOT – motilidade espermática (%): é a proporção de espermatozoides considerados móveis em relação ao total de espermatozoides no campo de visualização. (ii) VCL – Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ): indica a velocidade obtida considerando os vários pequenos deslocamentos ao longo da trajetória média da célula espermática. (iii) VSL – velocidade em linha reta ( $\mu\text{m/s}$ ): refere-se à velocidade obtida ao longo da linha reta entre o ponto inicial e o ponto final da trajetória. (iv) VAP – velocidade média de deslocamento ( $\mu\text{m/s}$ ): corresponde à velocidade na trajetória média percorrida pelo espermatozoide, desprezando os pequenos deslocamentos ao longo da trajetória média da célula espermática, ou seja, é uma velocidade em uma linha curva. (v) LIN – Linearidade (%): é a proporção entre a velocidade em linha reta (VSL) e a velocidade curvilínea (VCL), expressa em termos percentuais, um valor de 100% indicaria que os espermatozoides se movem em linha reta, e que não há pequenos deslocamentos ao longo da trajetória média da célula espermática. (vi) STR – Retilinearidade (%): representa a relação percentual entre a velocidade em linha reta (VSL) e a velocidade média da trajetória (VAP), sendo que quando o STR atinge 100%, significa que a trajetória média é uma linha reta, ou seja, a trajetória média da célula não é uma curva. (vii) BCF – frequência de batimentos transposto (Hz): é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento por segundo. (viii) WOB – Oscilação (%): reflete se a célula espermática efetuou pequenos deslocamentos ao longo da trajetória média do espermatozoide, calculada como a relação percentual entre a velocidade média de deslocamento (VAP) e a velocidade curvilínea (VCL); sendo que quando a oscilação atinge 100%, significa que os espermatozoides estão se movimentando sem pequenos deslocamentos ao longo da trajetória, o que é benéfico para a fertilização (Figura 2).

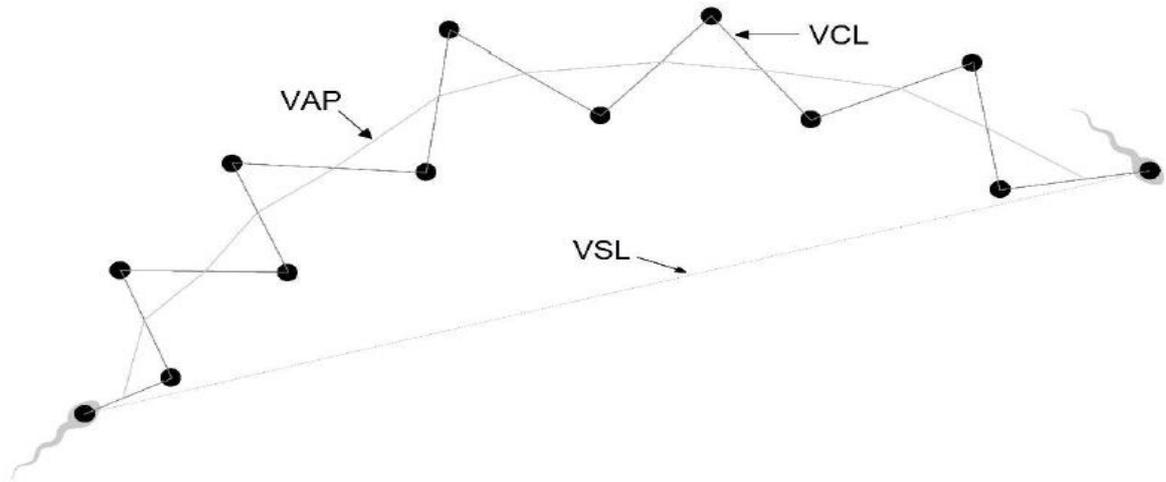


Figura 2. Esquema ilustrativo da trajetória de um espermatozoide e os diferentes deslocamentos levados em consideração para os cálculos das suas diferentes velocidades (Fonte: Spica, 2021). VCL - velocidade curvilínea; VAP- velocidade média de deslocamento; VSL - velocidade em linha reta.

## REFERÊNCIAS

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.

**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA**. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2024. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/>. Acesso em: 8 de julho. 2024.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, p. 208-217, 2013.

BALDISSEROTTO, B. Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives/Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-300, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. FUNEP; UNESP, 336 p., 2014.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil**. 2. Ed. Santa Maria: Editora UFMS, p. 175-179, 2013.

BRASILEIRO, D. L. **Reprodução de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) utilizando diferentes indutores**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 16 p.

CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CAROLSFELD, D. J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática**. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World Fish Trust, Curso de treinamento brasileiro, v. 47, 1999.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 1, p. 240-279, 2010.

DALMASS, H. F. et al. **Guide to Hormonal Induction of Rheophilic Fishes**. Curitiba, p. 11-13, 2016.

DIAS, R. M.; BAILLY, D.; ANTÔNIO, R. R.; SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin, Goiás State, Brazil) by the “lambari” *Astyanax altiparanae* (Tetragonopterinae; Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 467-476, 2005.

FAO (**Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Disponível em: <https://www.fao.org>.

org/publications/home/fao-flagship-publications/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture/en. Acesso em: 15 de julho. 2024.

FELIZARDO, V. O. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, 84 p.

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**, 416-417, 238-246, 2013.

GALO, J. M., STREIT Jr, D. P., POVH, J. A., FORNARI, D. C., RESENDE, E. K. D., OLIVEIRA, D. D., & RIBEIRO, R. P. Sperm quality of the Amazon catfish *Leirius marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. **Brazilian Journal of Biology**, 74, 933-938, 2014.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Editora UNESP, 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS**, Série Zoologia, v. 13, p. 65-88, 2003.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 353-360, 2003.

KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B.; AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the CellTrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 611-619, 1998.

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. **Panorama da Aqüicultura**, Laranjeiras, v. 14, n. 82, p. 27-39, 2004.

KUBITZA, F. **Reprodução, larvicultura e produção de alevinos de peixes nativos**. 1. ed. Jundiá: Aqua Supre Com. Suprim. Aquicultura Ltda, p. 7-24, 2004.

LEITE, N. G. Qualidade espermática do jundiá amazônico (*Leirius marmoratus* GILL, 1870) em diferentes tempos e temperaturas. 2021.

LEITE, P. H.; BARBOSA, L.; MOURA, M. F.; MARTINS, T. X.; POVH, J. A.; CAETANO, R. A.; CORREA, F. Sistema Bioflocos. **Anais da X Mostra Científica Fomez, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Serviço Público Federal, Ministério da Educação**. Campo Grande, v. 201, n. 7, p. 308-31, 2017.

MORTIMER, S. T.; VAN DER HORST, G.; MORTIMER, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 545-553, 2015.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1361-1365, 2004.

PADUA, N. H. et al. Conservação do sêmen da carpa, *Cyprinus carpio*, variedade ornamental, por resfriamento. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 1, p. 63-72, 2012.

PEÑARANDA, D. S.; PÉREZ, L.; GALLEGOS, V.; BARRERA, R.; JOVER, M.; ASTURIANO, J. F. Diluente de esperma de enguia europeia para armazenamento de curto prazo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 3, p. 407-415, 2010.

PIRES, L. B.; SANCHES, E. A.; ROMAGOSA, E.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; NASS, R. A. R.; LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after room-temperature and cold storage. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n. 3, p. 747-753, 2019.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 101-116, 2005.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. First chromosome characterization in the neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). **Cytologia**, v. 70, n. 3, p. 283-286, 2005.

POUPARD, G. P.; PAXION, C.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. **Aquaculture**, v. 160, n. 3-4, p. 317-328, 1998.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelação e uso de antioxidantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 4, p. 194-199, 2016.

SANCHES, E. G.; 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.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 4, p. 293-305, 2010.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1673-1680, 2011.

SILVA, F. C.; KUHNEN, V. V.; SANCHES, E. G. Refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 05, p. 1557-1564, 2018.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservação de gametas de peixes. **Simpósio Internacional sobre Fisiologia Reprodutiva de Peixes**, p. 114-22, 1982.

STREIT JUNIOR, D. P.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; GALO, J. M.; GUERREIRO, L. R. J.; OLIVEIRA, D. D.; GODOY, L. C. Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui, 2012.

TREIN, C. S. Motilidade espermática de jundiá (*Rhamdia quelen*) em diferentes temperaturas e fontes de água. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Pampa, Curso de Aquicultura, 2018.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. Reviews in **Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 6, p. 858-865, 2011.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2015.

## ARTIGO

O resfriamento amplia a viabilidade do sêmen do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)

### RESUMO

objetivo deste estudo foi verificar se as características do sêmen do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) se mantêm ao longo do tempo, quando armazenado em diferentes condições de temperatura e tempo. Foram utilizados 20 machos sexualmente maduros. Os peixes foram induzidos à reprodução com 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg. Após 220 horas-grau, o sêmen coletado foi armazenado por até 40 horas em duas temperaturas distintas: temperatura ambiente ( $22,9 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ) e resfriado ( $12,2 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ ). Em cada um destes tratamentos (temperaturas) foi utilizado o peixe como repetição, sendo 10 repetições por temperatura de armazenamento. As características do sêmen foram analisadas a cada 10 horas usando o software CASA/ImageJ. A motilidade espermática (MOT) com 10 e 20 horas foi maior ( $P < 0,05$ ) no sêmen mantido resfriado (78,10%; 60,78%) em relação ao sêmen mantido em temperatura ambiente (39,52%; 14,59%). Apenas o sêmen resfriado apresentou motilidade até 40 horas. Até 20 horas, não houve diferença significativa na velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL) entre o sêmen armazenado em temperatura ambiente e resfriado. Contudo, após 20 horas, apenas o sêmen resfriado apresentou valores detectáveis para essas variáveis. Em geral, o resfriamento foi eficiente para manter as características do sêmen, principalmente com 30 e 40 horas de armazenamento considerando que apenas nessa condição de armazenamento o sêmen apresentava viabilidade. Conclui-se que o resfriamento do sêmen de *A. lacustris* permite ampliar a viabilidade dos espermatozoides em até 20 horas sem comprometer sua qualidade na maioria das características analisadas, mantendo ainda a capacidade de fertilização até 40 horas de armazenamento, embora com menor qualidade seminal.

**Palavras-chave:** características seminais, conservação gamética, motilidade espermática, reprodução induzida, velocidade seminal.

## *1. Introdução*

O lambari-do-rabo-amarelo é uma espécie Neotropical Sul-Americana de grande relevância na aquicultura, sendo valorizada tanto para consumo humano quanto como isca viva na pesca esportiva. De acordo com o IBGE (2023), a produção de lambari teve um grande aumento em sua produção, passando de 255 toneladas em 2013 para 599 toneladas em 2022, o que representa um aumento de 43%. A espécie tem como principais características favoráveis para a produção: (i) dimorfismo sexual aparente, (ii) desova parcelada, (iii) boa aceitação de alimentos artificiais, (iv) alta prolificidade e (v) crescimento acelerado, apesar de seu tamanho pequeno (Porto-foresti et al., 2005). Embora o lambari possa apresentar reprodução natural em determinadas condições, frequentemente tem se realizado reprodução induzida nas espécies de lambari, com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e de garantir um planejamento mais eficiente através da sincronização das desovas, otimizando a produção e assegurando um padrão de tamanho adequado para a comercialização (Gonçalves et al., 2014).

Para a reprodução induzida do lambari, comumente tem se utilizado o sistema reprodutivo seminatural, uma vez que, devido ao seu tamanho, a extrusão dos gametas pode resultar em altas taxas de mortalidade dos reprodutores (Brambila-Souza et al., 2019; Lira et al., 2018; Porto-Foresti et al., 2018). No entanto, a reprodução com extrusão é fundamental para avaliação de protocolos reprodutivos e de conservação de gametas. Esta última prática pode ser útil para a conservação genética e também de aplicação na aquicultura, pois permite transportar gametas de uma piscicultura (ou de um determinado rio) sem a necessidade de levar o reprodutor. Além disso, resultados satisfatórios obtidos com o lambari, que é um peixe de pequeno porte, podem fornecer dados que poderão, em um segundo momento, ser aplicado a outras espécies Neotropicais Sul-Americanas, principalmente para as espécies comerciais de maior tamanho, em que muitas vezes há uma limitação do número de repetições.

Considerando que os espermatozoides perdem a qualidade com o tempo após a coleta, métodos de armazenamento são empregados para garantir que o sêmen permaneça viável por mais tempo, isso otimiza o uso dos reprodutores e torna os procedimentos de reprodução artificial mais eficientes (Sanches et al., 2015). O armazenamento do sêmen refrigerado pode trazer algumas vantagens para a reprodução artificial de peixes, permitindo a redução de custos com a manutenção do estoque parental, bem como minimizando os inconvenientes da assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas durante a época de reprodução. Portanto, os recursos relacionados aos procedimentos de reprodução artificial em pisciculturas podem ser otimizados (Galo et al., 2014). Além disso, essa técnica possui custos mais baixos em

comparação com a técnica de congelamento e não requer o uso de crioprotetores (Billard et al., 2004; Carneiro et al., 2006).

Existem conhecimentos consolidados sobre os procedimentos de armazenamento de sêmen em algumas espécies de peixes. No entanto, há uma carência de estudos para várias espécies Neotropicais Sul-Americanas, especialmente aqueles relevantes para programas de recuperação ambiental e para aquelas com grande potencial para a aquicultura (Carneiro, 2007). A reprodução de peixes nativos enfrenta desafios significativos devido à falta de protocolos específicos para reprodução, e essa ausência impede a melhoria da eficiência reprodutiva. O objetivo deste estudo foi verificar se as características do sêmen do lambari-do-rabo-amarelo se mantêm ao longo do tempo, quando armazenado sob resfriamento.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Local, animais

O estudo foi conduzido no laboratório da Estação Experimental de Piscicultura (20°30'04,6" S, 54°36'37,8" W) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS (1.083/2019).

Foram utilizados 20 machos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) no experimento. Os peixes estavam alocados em tanque de 100 m<sup>2</sup>, com troca parcial de água em torno de 10% ao dia. Os Peixes foram alimentados com ração extrusada (proteína bruta 32%), na quantidade de 1% de peso vivo ao dia

### 2.2. Indução hormonal

Para indução hormonal, foi utilizado extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), administrado em dose única de 2,5 mg /kg de peso vivo conforme recomendado por Woynarovich & Horvath (1989). O hormônio foi aplicado via intraperitoneal, na base da nadadeira peitoral enquanto os peixes estavam contidos.

### 2.3. Coleta de sêmen

Após 180-220 horas-grau após a indução hormonal (Dalmass et al., 2016), os peixes foram anestesiados com eugenol (50 mg/L) para realizar o procedimento de extrusão. Para isso, a papila urogenital foi seca com papel toalha e, em seguida, realizou-se leve pressão na região

abdominal no sentido encéfalo-caudal para a coleta do sêmen (em seringas de 1mL), conforme descrito por Woynarovich & Horvath (1989).

#### 2.4. Delineamento experimental

O experimento consistiu em avaliar duas formas de armazenamento do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo, compondo os seguintes tratamentos: (i) sêmen mantido em temperatura ambiente ( $22,9 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ) por 0, 10, 20, 30 e 40 horas (representando o grupo controle); e (ii) sêmen mantido em condições de resfriamento ( $12,2 \pm 2,3^\circ\text{C}$ ) por 0, 10, 20, 30 e 40 horas. Para o tratamento em que houve resfriamento, as seringas foram armazenadas diretamente em uma caixa de isopor (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 20 cm de altura) contendo gelo (uma camada de 4 cm), posicionadas sobre um suporte 2 cm acima do gelo, conforme protocolo adaptado de Pires et. al (2019). Em cada um destes tratamentos foi utilizado o peixe como repetição, sendo 10 repetições por temperatura de armazenamento (Figura 3). A qualidade espermática foi avaliada a cada 10 horas até que a motilidade dos espermatozoides fosse completamente perdida.

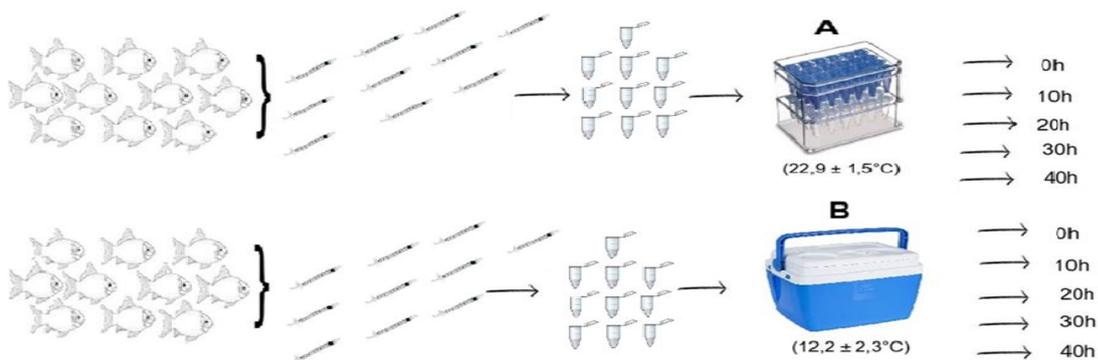


Figura 3. Modelo experimental referente às diferentes temperaturas de armazenamento. A) armazenamento em temperatura ambiente; B) armazenamento sob refrigeração.

#### 2.5. Características seminais

Logo após a coleta, uma alíquota de sêmen de cada macho foi examinada no microscópio óptico, para garantir que não apresentavam motilidade devido à contaminação por água ou urina. A Análise seminal computadorizada assistida (CASA) foi realizada usando o software gratuito ImageJ/Casa, conforme descrito por Wilson-leedy & Ingermann (2007).

Foram avaliadas as seguintes características utilizando o CASA: taxa de motilidade espermática (MOT); velocidade curvilinear (VCL); velocidade média de deslocamento (VAP); velocidade em linha reta (VSL); retilinearidade (STR); oscilação (WOB); progressão (PROG);

frequência de batimentos transposto (BCF) e número de espermatozoides (SPTZs); Os valores de linearidade (LIN) foram calculados através da relação percentual entre (VSL/ VCL) \*100, e número de espermatozoides por 100 (SPTZs).

Para conduzir essas análises, os espermatozoides foram ativados utilizando uma solução de água destilada e colocados em uma Câmara hematimétrica de Neubauer. Foi utilizado um microscópio de luz trinocular (Solaris, Bel Engineering, Monza, Italy) para realizar as observações, as imagens foram registradas precisamente no momento da ativação dos espermatozoides e capturadas por uma câmera (AG 120gc Basler, Ahrensburg, Germany) conectada a um computador. O software utilizado para a gravação dos vídeos foi o Pylon (<http://www.baslerweb.com>) e a duração de cada vídeo foi de 60 segundos. Os vídeos foram gravados e depois editados usando o software VirtualDub 1.9.0 e salvos em uma pasta específica. Em seguida, esses vídeos foram submetidos à análise pelo plugin CASA instalado no software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). As análises foram realizadas após 10 segundos do início da gravação dos vídeos, com uma taxa de quadros de 100 fps.

## 2.6. Análise estatística

Os dados das características de qualidade de sêmen do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) foram submetidos a Análise de Medidas Repetidas no Tempo (KAPS e LAMBERSON, 2017), utilizando o método da máxima verossimilhança restrita e a metodologia dos modelos mistos, pelo procedimento MIXED do SAS, com as seguintes causas de variação no modelo: tratamento, tempo, interação entre tratamento e tempo, e resíduo. Para escolher a melhor estrutura da matriz de covariâncias foram analisadas as várias estatísticas fornecidas pelo procedimento MIXED do SAS: -2 Res Log Likelihood (RLL), Akaike's Information Criterion (AIC) e Schwarz's Bayesian Criterion (BIC), seguindo as orientações de Littell et al. (2006). Quanto menor o valor dessas estatísticas, melhor a estrutura.

Para testar a adequação da estrutura escolhida em relação a estrutura  $I\sigma^2$  (erros independentes) foi observado o resultado do Teste da Razão de Verossimilhança Restrita em relação ao modelo nulo. Testou também a esfericidade da matriz de covariâncias pelo Teste de Mauchly, para testar se a análise considerando parcelas divididas no tempo - Usada no PROC GLM – é melhor que a especificada no PROC MIXED. Foram avaliadas quatorze estruturas para a matriz de covariâncias. As médias de mínimos quadrados foram comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 0,05.

## 3. RESULTADOS

Houve interação significativa para as características seminais motilidade, VCL, VAP, VSL e PROG (Tabela 1). Os resultados mostram que essas variáveis são afetadas de forma distintas ao longo do tempo dependendo temperatura de armazenamento. A motilidade espermática (MOT) com 10 horas foi maior ( $P<0,05$ ) no sêmen armazenado sob resfriamento (78,10%) em relação ao sêmen mantido em temperatura ambiente (39,52%). O mesmo foi observado com 20 horas de armazenamento, com maior ( $P<0,05$ ) motilidade espermática no sêmen mantido sob resfriamento, sendo que a magnitude da diferença entre as duas formas de armazenamento foi maior. O sêmen em temperatura ambiente não apresentou motilidade com 30 e 40 horas, enquanto o sêmen resfriado a motilidade espermática não se alterou até 20 horas. Com 30 e 40 horas a motilidade espermática diferiu significativamente apenas em relação ao tempo zero e 10 horas (Figura 4).

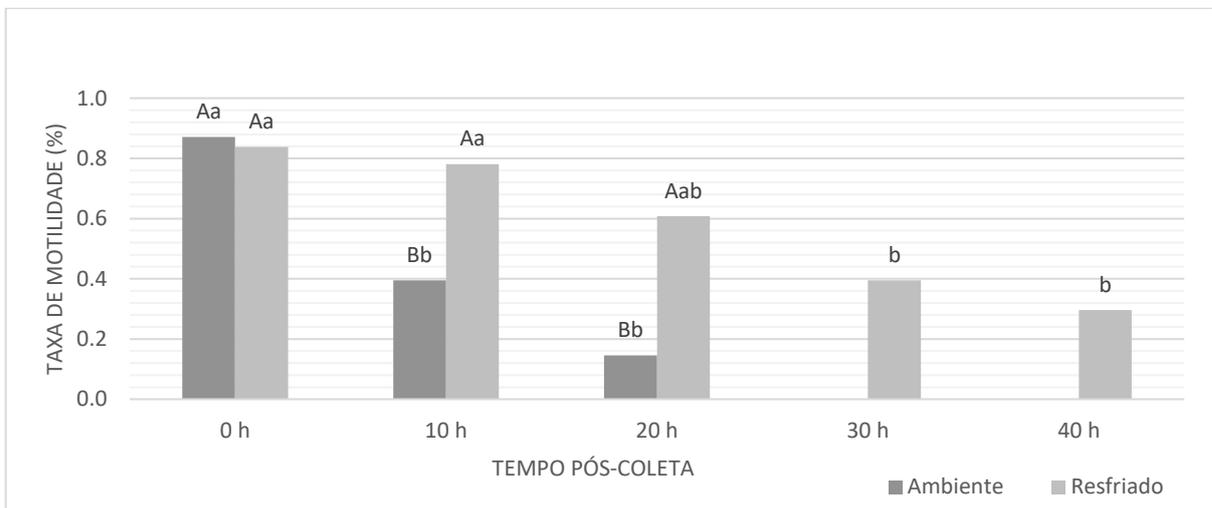


Figura 4. Taxa de motilidade espermática do sêmen de *A. Lacustris* armazenado por 40 horas. Letras maiúsculas apresentam diferença entre os tratamentos (Ambiente x Resfriado); e letras minúsculas apresentam diferenças entre os tempos pelo Teste de Tukey-Kramer ( $P<0,05$ ).

Até 20 horas não houve diferença significativa na velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL) entre as duas formas de armazenamento, sendo que com 30 e 40 horas apenas o sêmen resfriado apresentou estas velocidades. O sêmen mantido em temperatura ambiente apresentou redução na VCL, VAP e VSL com 10 horas em relação ao tempo zero, a qual foi mantido com 20 horas. No sêmen resfriado o VCL foi maior ( $P<0,05$ ) com 10 horas em relação a 20 horas de armazenamento, não tendo diferença significativa nos demais tempos; e VAP e VSL foram reduzidas em relação ao tempo 0 apenas a partir 20 horas (Tabela 1).

A retilinearidade (STR) e o número de espermatozoides (SPTZs) não diferiram significativamente entre as formas de armazenamentos (ambiente e resfriado) em nenhum dos

tempos avaliados, e dentro das formas de armazenamento nos diferentes tempos. Da mesma forma, a oscilação (WOB), frequência de batimentos transposto (BCF) e a linearidade (LIN) não diferiram entre as diferentes formas de armazenamento em nenhum dos tempos avaliados, mas no sêmen refrigerado a WOB e LIN foi mantida até 10 horas e na BCF houve um aumento com 30 horas em relação ao tempo 0 (Tabela 1).

A progressão (PROG) com 10 horas foi maior ( $P<0,05$ ) no sêmen mantido resfriado (669,3  $\mu\text{m/s}$ ) em relação ao mantido em temperatura ambiente (551,63  $\mu\text{m/s}$ ). A PROG diminuiu ( $P<0,05$ ) com 10 horas no sêmen mantido em temperatura ambiente e com 20 horas no sêmen resfriado, sendo que a partir destes tempos os valores não diferiram nas diferentes formas de armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias de mínimos quadrados de características de qualidade de sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) mantido em temperatura ambiente ( $22,9 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ) e resfriado ( $12,2 \pm 2,3^\circ\text{C}$ ), e avaliado em diferentes tempos.

<b>Qualidade do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (<i>Astyanax lacustris</i>)</b>				
<b>Tempo de armazenamento</b>	<b>Tratamento</b>			<b>Valor-p</b>
	<b>Ambiente</b>	<b>Resfriado</b>	<b>Média</b>	
<b>Motilidade (%)</b>				
<b>0 h</b>	87,15 Aa	83,80 Aa	-	0,0004 <sub>1</sub>
<b>10 h</b>	39,52 Bb	78,10 Aa	-	<0,0001 <sub>2</sub>
<b>20 h</b>	14,59 Bb	60,78 Aab	-	<0,0001 <sub>3</sub>
<b>30 h</b>	-	39,52 b	-	
<b>40 h</b>	-	29,61 b	-	
<b>Média</b>	-	-		
<b>VCL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>				
<b>0 h</b>	656,273 Aa	607,279 Aab	-	0,4002 <sub>1</sub>
<b>10h</b>	534,585 Ab	616,845 Aa	-	0,0002 <sub>2</sub>
<b>20 h</b>	509,090 Ab	533,660 Ab	-	0,0002 <sub>3</sub>
<b>30h</b>	-	562,352 ab	-	
<b>40h</b>	-	540,516 ab	-	
<b>Média</b>	-	-		
<b>VAP (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>				
<b>0 h</b>	495,319 Aa	454,651 Aa	-	0,5980 <sub>1</sub>
<b>10 h</b>	367,801 Ab	447,399 Aab	-	<0,0001 <sub>2</sub>
<b>20 h</b>	349,302 Ab	346,665 Ab	-	0,0063 <sub>3</sub>
<b>30 h</b>	-	378,636 ab	-	
<b>40 h</b>	-	353,043 b	-	
<b>Média</b>	-	-		

(continuação tabela 1)

Tempo de armazenamento	Tratamento			
	Ambiente	Resfriado	Média	Valor- <i>p</i>
<b>VSL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>				
0 h	475,120 Aa	436,550 Aa	-	0,6078 <sub>1</sub>
10 h	353,513 Ab	429,242 Aa	-	<0,0001 <sub>2</sub>
20 h	335,329 Ab	332,412 Ab	-	0,0074 <sub>3</sub>
30 h	-	364,360 b	-	
40 h	-	338,686 b	-	
Média	-	-		
<b>STR (%)</b>				
0 h	95,92	96,00	95,96 a	0,4193 <sub>1</sub>
10 h	96,08	95,94	96,01 a	0,5081 <sub>2</sub>
20 h	96,08	95,81	95,95 a	0,5529 <sub>3</sub>
30 h	-	96,20	96,20 a	
40h	-	95,86	95,86 a	
Média	96,03 A	95,96 A		
<b>WOB (%)</b>				
0 h	75,43	74,71	75,07 a	0,6183 <sub>1</sub>
10 h	68,68	72,14	70,41 a	<0,0001 <sub>2</sub>
20 h	69,13	64,10	66,62 b	0,1029 <sub>3</sub>
30 h	-	67,21	67,21 b	
40 h	-	64,90	64,90 b	
Média	71,08 A	68,61 A		
<b>PROG (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
0 h	739,79 Aa	679,59 Aa	-	0,6120 <sub>1</sub>
10 h	551,63 Bb	669,37 Aa	-	<0,0001 <sub>2</sub>
20 h	523,52 Ab	518,10 Ab	-	0,0070 <sub>3</sub>
30 h	-	568,45 b	-	
40 h	-	528,05 b	-	
Média	-	-		
<b>BCF (Hz)</b>				
0 h	401,108	389,636	395,372 b	0,2105 <sub>1</sub>
10h	407,739	407,687	407,713ab	0,0065 <sub>2</sub>
20 h	409,643	394,949	402,29 ab	0,6596 <sub>3</sub>
30 h	-	428,919	428,919 a	
40 h	-	410,576	410,576ab	
Média	406,163 A	406,353 A		
<b>LIN (%)</b>				
0 h	72,36	71,73	72,05 a	0,5956 <sub>1</sub>
10 h	65,99	69,22	67,61 ab	0,0002 <sub>2</sub>
20 h	66,42	61,43	63,93 b	0,1122 <sub>3</sub>
30 h	-	64,66	64,66 b	
40 h	-	62,24	62,24 b	
Média	68,26 A	65,86 A		

(continuação tabela 1)

Tempo de armazenamento	Tratamento			Valor- <i>p</i>
	Ambiente	Resfriado	Média	
		<b>SPTZs</b>		
<b>0 h</b>	833,333	785,000	809,167 a	0,9436 <sub>1</sub>
<b>10 h</b>	901,966	832,000	866,983 a	0,2473 <sub>2</sub>
<b>20 h</b>	767,672	859,052	813,362 a	0,6423 <sub>3</sub>
<b>30 h</b>	-	644,832	644,832 a	
<b>40 h</b>	-	863,333	863,333 a	
<b>Média</b>	834,324 A	796,843 A		

1 - Valor-*p* obtido para as seguintes causas de variação no modelo: tratamento<sub>1</sub>, tempo<sub>2</sub> e a interação entre estes<sub>3</sub>. As médias de mínimos, quadrados foram comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 0,05; onde, letras maiúsculas nas linhas apresentam diferença entre os tratamentos (Ambiente x Resfriado); e letras minúsculas na coluna apresentam diferenças entre os tempos. MOT- motilidade espermática; VCL - velocidade curvilínea; VAP- velocidade média de deslocamento; VSL - velocidade em linha reta; STR - retilinearidade; WOB - oscilação; PROG- progressão; BCF - frequência de batimentos transposto; LIN - linearidade; (SPTZs) – número de espermatozoides.

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que o resfriamento preserva a qualidade do sêmen por um período maior em comparação com o armazenamento em temperatura ambiente. Embora a qualidade do sêmen mantido em temperatura ambiente seja perdida em 20 horas, o sêmen resfriado mantém a viabilidade por até 40 horas. Esta prática se torna importante para a reprodução quando o intervalo entre coletas e a utilização dos gametas é relativamente curto, principalmente devido ao menor custo com o resfriamento em comparação com a técnica de congelamento (He & Woods, 2003). Além disso, os resultados indicam que é possível aumentar o tempo de preservação da qualidade do sêmen de forma acessível, por meio de uma prática relativamente simples. De acordo com Carneiro et al (2006), embora o armazenamento do sêmen por resfriamento não prolongue a viabilidade dos espermatozoides por períodos tão longos quanto as técnicas de congelamento, ele possibilita um aumento significativo no tempo de motilidade espermática quando comparado ao sêmen mantido em temperatura ambiente.

A qualidade do sêmen é uma característica essencial para um bom desempenho reprodutivo (Galo et al., 2014), sendo essencial para a obtenção de taxas de fertilização e eclosão no processo reprodutivo (Gallego et al., 2013). Entre as características qualitativas, a motilidade espermática é uma das mais importantes em diversas espécies (Billard et al., 1995), e está altamente correlacionada com as taxas de fertilização e eclosão (Bobe & Labbé, 2010). Alguns fatores físicos, como a temperatura, podem afetar a motilidade espermática (Casson, 2016). Em geral, a motilidade pode variar conforme a espécie, mas geralmente não ultrapassa dois minutos (Rurangwa et al., 2004). As análises de motilidade são muito úteis para comparar

diferentes condições experimentais, como procedimentos de coleta, meio de diluição espermática e condições de armazenamento, a motilidade espermática também é amplamente utilizada para avaliar o efeito de biotecnologias como criopreservação (Bobe & Labbé, 2010). A motilidade espermática observada no início do experimento foi semelhante ao observado por outros autores em lambari-do-rabo-amarelo, tais como observado por Yasui et al. (2015; 85,0%) e Carneiro-leite et al., (2023; 83,4%). Observa-se que com 10 horas a motilidade espermática ainda ficou próximo ao valor obtido pelos referidos autores, indicando que o protocolo de resfriamento utilizado foi efetivo para a conservação do sêmen.

Poucos trabalhos com avaliação seminal são observados em lambari, considerando que geralmente é aplicado o sistema reprodutivo seminatural. Nesse sentido, faltam informações quanto a outros protocolos de resfriamento no lambari. Em outras espécies Neotropicais Sul-Americanas, alguns trabalhos também evidenciaram que o resfriamento proporcionou prolongamento da qualidade seminal, tal como observado para *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus* em que a motilidade passou de 90% logo após a coleta para 40% após 20 horas da coleta e armazenamento; para *Leporinus friderici* e *Leporinus elongatus*, em que a motilidade foi de 80% logo após a coleta para 30% após 8 horas de coleta e armazenado sob refrigeração ( $4,9 \pm 1,7^\circ\text{C}$ ; Marques & Godinho, 2004); e para *Colossoma macropomum*, a motilidade espermática passou de 98% logo após a coleta para 33,72% após 25 horas de armazenamento ( $16,9 \pm 2,1^\circ\text{C}$ ; Pires et al., 2019). O prolongamento da motilidade espermática no sêmen armazenado em temperaturas baixas pode ser explicado pela redução do metabolismo dos espermatozoides causada pelo resfriamento, ao serem resfriados, os espermatozoides diminuem sua atividade metabólica, o que resulta em uma menor taxa de consumo de energia, isso ajuda a manter sua capacidade de movimento por um período mais longo (Billard, 1992).

As características, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e a velocidade em linha reta (VSL), demonstraram que essas métricas foram melhor preservadas no sêmen mantido sob resfriamento, sendo que essas características são essenciais para a fertilidade, e o estudo constatou que mesmo após 40 horas o valor de VCL do sêmen resfriado ainda eram adequados para a fertilização. Os espermatozoides são considerados imóveis quando a VCL é inferior a  $20 \mu\text{m/s}$  (Gallego et al., 2017). No presente estudo, a VCL após 40 horas foi de  $540,516 \mu\text{m/s}$ , sendo, portanto, considerada aceitável. A retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e o (BCF) frequência de batimentos transposto, tiveram um melhor desempenho no sêmen armazenado sob resfriamento, permanecendo mensuráveis até 40 horas, sugerindo ainda uma boa viabilidade dos espermatozoides. A progressão (PROG) dos espermatozoides diminuiu de maneira mais rápida no sêmen armazenamento em temperatura

ambiente, enquanto foi mantida em níveis satisfatórios sob resfriamento por até 40 horas. A redução na qualidade dos espermatozoides à temperatura ambiente pode estar associada ao aumento das taxas metabólicas das células espermáticas quando submetidas a altas temperaturas (Billard et al., 1995). No geral, o trabalho demonstra que o resfriamento é um método prático e eficiente para preservar a qualidade do sêmen de *A. lacustris*, garantindo maior potencial de fertilidade durante os períodos de armazenamento.

## 5. CONCLUSÃO

O sêmen de *Astyanax lacustris* pode ser conservado sob condições de resfriamento por até 40 horas mantendo a viabilidade para fertilização de ovócitos. O armazenamento de sêmen em temperatura ambiente promove a queda brusca de qualidade, tornando as células espermáticas inviáveis a partir de 20 horas pós-coleta.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

## REFERÊNCIAS

- BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G., LINHART, O., 1995. Sperm biology and artificial reproduction in carps. *Aquaculture*, vol. 124, pp. 95-112.
- BILLARD, R. and COSSON, M. P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *The Journal of Experimental Zoology*, vol. 261, pp. 22–31.
- BILLARD, R.J., COSSON, S.B., NOVEIRI, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, vol. 236, pp. 1-9.
- BOBE, J., LABBÉ, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 165, no. 3, pp. 535-548.
- BRAMBILA-SOUZA, G., MYLONAS, C.C., MELLO, P.H., KURADOMI, R.Y., BATLOUNI, S.R., TOLUSSI, C.E.; MOREIRA, R.G., 2019. Thermal manipulation and GnRH therapy applied to the reproduction of yellow-tailed lambari, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 279, pp. 120-128.
- CARNEIRO, P.C.F., 2007. Technologies for production and storage of fish semen. *Brazilian Journal of Animal Reproduction*, vol. 31, pp. 361-366.
- CARNEIRO, P.C.F., SEGUI, M.S., IÓRIS FILHO, C.R., MIKOS, J.D., 2006. Viability of jundiá, *Rhamdia quelen*, semen stored under refrigeration. *Academic Journal of Animal Science*, vol. 4, no. 3, pp. 11-16.

- CARNEIRO-LEITE, L., SILVA, L.P.D.; PAZZINI, H.B., LOBATO, S.I.R., BORGES, L.P., REIS, Y.D.S., NINHAUS-SILVEIRA, A., 2023. Effect of dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids from *Astyanax lacustris* males on semen quality. *Neotropical Ichthyology*, vol. 21, e230077.
- COSSON, J., 2016. Flagella parameters used as descriptors of fish spermatozoa motility. *Animal Reproduction Science*, vol. 100, no. 169, pp. 128-129.
- DALMASS, F., CARRARI, I.F., CESCO, I.S., NOVAKI, M., 2016. Guide to Hormonal Induction of Rheophilic Fishes. Curitiba.
- GALLEGO, V., CAVALCANTE, S.S., FUJIMOTO, R.Y., CARNEIRO, P.C.F., AZEVEDO, H.C., MARIA, A.N., 2017. Fish sperm subpopulations: changes after cryopreservation process and relation with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*, vol. 87, pp. 16-24.
- 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*, v. 416-417, pp. 238-246.
- GALO, J.M.; STREIT JR, D.P.; POVH, J.A.; FORNARI, D.C.; RESENDE, E.K.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R.P., 2014. Sperm quality of the Amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 74, pp. 933-938.
- HE, S., WOODS, L. C., 2003. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*, v. 46, pp. 17-25.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2023. Available from: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>
- LIRA, L.V.G., KURADOMI, R.Y., SOUZA, T.G., HAINFELLNER, P., BATLOUNI, S.R., 2018. Ovarian maturation of *Astyanax altiparanae* after spawning in water recycling systems. *Bulletin of the Institute of Fisheries*, vol. 44, pp. 1-10.
- MARQUES, S., GODINHO, H.P., 2004. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 47, pp. 799-804.
- PIRES, L.B., SANCHES, E.A., ROMAGOSA, E., CORRÊA FILHO, R.A.C., NASS, R.A.R., LOPERA-BARRERO, N.M., POVH, J.A., 2019. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after room-temperature and cold storage. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 35, no. 3, pp. 747-753.
- PORTO-FORESTI, F., CASTILHO-ALMEIDA, R.B., SENHORINI, J.A., FORESTI, F., 2018. Biology and breeding of the yellow-tailed lambari (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C., eds. Native species for fish farming in Brazil. Santa Maria: UFSM Publisher, pp. 101-115.
- PORTO-FORESTI, F., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., 2005. First chromosomal characterization of the neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytology*, vol. 70, no. 3, pp. 283-286.
- RURANGWA, E., KIME, D.E.; OLLEVIER, F., NASH, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, vol. 234, pp. 1-28.
- SANCHES, E., OKAWARA, R.Y., CANEPPELE, D., TOLEDO, C.P.R., BOMBARDELLI, R.A., ROMAGOSA, E., 2015. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae*

(Steindachner, 1877) throughout 112 h of storage at four temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 31, pp. 79-88.

WILSON-LEEDY, J.G., INGERMANN, R.L., 2007. Development of a new CASA system based on open-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, vol. 67, no. 3, pp. 661-672.

WOYNAROVICH, E., HORVÁTH, L., 1989. The artificial propagation of tropical fish: an extension manual. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 225 p.

YASUI, G.S., SENHORINI, J.A., SHIMODA, E., PEREIRA-SANTOS, M., NAKAGHI, L.S.O., FUJIMOTO, T., ARIAS-RODRIGUEZ, L., SILVA, L.A., 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, vol. 9, no. 3, pp. 464-470.