

Vanessa Martins da Rocha

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE NEOMACHOS DE
Rhamdia quelen

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Alex Pires de Oliveira Nuñez

Coorientador: Luciano Augusto Weiss

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rocha, Vanessa Martins da

Caracterização do sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen* / Vanessa Martins da Rocha ; orientador, Alex Pires de Oliveira Nuñez, coorientador, Luciano Augusto Weiss, 2017.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. CASA. 3. Concentração. 4. Morfologia de espermatozoides. 5. Taxa de fertilização. I. Nuñez, Alex Pires de Oliveira . II. Weiss, Luciano Augusto . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Caracterização do sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen*

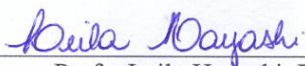
Por

VANESSA MARTINS DA ROCHA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

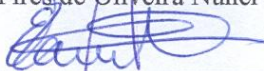


Prof.a. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do Programa

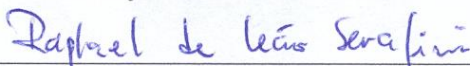
Banca Examinadora:



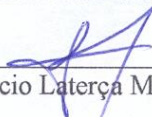
Dr. Alex Pires de Oliveira Nuner – *Orientador*



Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



Dr. Raphael de Leão Serafini - EPAGRI



Dr. Marício Laterça Martins - UFSC

Dedico este trabalho a todos aqueles que passam por esse processo e que ao longo da caminhada aprendem muito mais do que conta essas páginas.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, aquele que me fortalece diariamente e me conduz por todos os lugares que eu vou. Obrigada por sua proteção, amor e por tornar tudo possível.

Aos meus amados pais Cicero e Roseli por serem sempre presentes na minha vida através de gestos, palavras ou orações... Um carinho e um amor imenso por vocês! Vocês e a Érika (minha irmã querida) são o que eu tenho de mais importante nessa vida!

A Jamilly e ao Rodrigo, que logo no início da minha vida em Floripa se tornaram meus grandes amigos. Agradeço as conversas, conselhos, viagens e todos os momentos juntos.

Ao orientador Alex Nuñez, pela serenidade no olhar e pela tranquilidade que sempre transmite. Sua contribuição foi além da estruturação do experimento. Obrigada pelos ensinamentos que ficam.

Ao Luciano Weiss pelos valiosos ensinamentos com o Jundiá e pela parceria durante todo o período do mestrado. Obrigada por ser um coorientador muito presente e sempre preocupado em ajudar.

Ao Jurandir Bernardes que me ajudou diretamente na realização do experimento com as análises de motilidade e por me direcionar (mesmo à distância) na condução das outras análises.

A Alexia, Emília e ao Diogo pela amizade e companhia constante.

Ao Orbino, Maíra, Fabíola e Lizi que além de queridos amigos, foram “luz” em muitas tardes, finais de semana e noites no laboratório. Obrigada por fazerem tudo ficar mais leve.

A Susan pela parceria, tanto no experimento dela quanto no meu, muita troca e experiências adquiridas.

As minhas grandes amigas Bruna, Paloma, Larissa e Marcia que mesmo longe fisicamente foram muito presentes ao longo dessa caminhada.

Ao Pedrão, Ronaldo e Maurício por terem sido tão próximos e por terem me convidado tantas vezes para a piscicultura e para as coletas de ictiofauna. Agradeço todos os ensinamentos proporcionados, as risadas intermináveis e o carinho de vocês.

Através da Renata Guerreschi agradeço a todos profissionais do LAPAD que contribuíram de alguma forma nessa etapa, desde os técnicos aos vigias (pessoas tão presentes no nosso dia-a-dia). Gratidão imensa!

Ao Carlito por toda ajuda oferecida durante o período de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Aquicultura da UFSC pelos ensinamentos e por dedicarem seu tempo na formação de outros profissionais.

Aos colegas Bruno, Jhon, Carlos, Samira e Léo pela ajuda que prestaram em determinados momentos da realização deste trabalho.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Evoy Zaniboni, Raphael Zerafini, e Maurício Laterça pelas valiosas contribuições e por serem profissionais tão disponíveis em ajudar.

“Não coloque muita atenção nos erros cometidos.
Só o bem que ainda pode ser feito merece o nosso
empenho.”

Padre Fábio de Melo

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar a qualidade do sêmen de neomachos de jundiá, *Rhamdia quelen*, através de parâmetros qualitativos e quantitativos. O sêmen foi coletado e caracterizado por meio do volume e concentração do sêmen, motilidade, morfologia e integridade dos espermatozoides, espermatócrito e taxa de fertilização e posteriormente comparado ao sêmen de machos genotípicos utilizando análise estatística. Na coleta realizada em setembro/2016, neomachos apresentaram qualidade do sêmen similar à de machos genotípicos, mas apresentaram espermatozoides com menor porcentagem de células ($p < 0,05$) com morfologia normal ($69,0 \pm 10,0\%$) e menos viáveis a fertilização ($47,6 \pm 20,5$). Em abril/2017 os parâmetros avaliados pelo sêmen de um único neomacho foram similares ao sêmen de machos genotípicos. Na coleta realizada em junho/2017 foi observada menor qualidade do sêmen de neomachos, acentuando as diferenças entre os grupos avaliados. Diferenças encontradas no sêmen indicaram que o tratamento hormonal usado para a inversão do sexo afetou a qualidade dos espermatozoides. No entanto, neomachos de *Rhamdia quelen* apresentaram liberação do sêmen e foram capazes de realizar a fecundação dos ovócitos e gerar descendentes.

Palavras-chave: Aquicultura. CASA. Concentração. Morfologia de espermatozoides. Taxa de fertilização.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the semen quality of jundiá neomales, *Rhamdia quelen*, through qualitative and quantitative parameters. Semen was collected and characterized by the volume and concentration of semen, motility, morphology and sperm integrity, spermatocrit and fertilization rate and later compared to semen of genotypic males using statistical analysis. In the sampling made in September/2016, neomales presented semen quality similar to that of genotypic males, but presented spermatozoa with a lower percentage of cells ($p < 0.05$) with normal morphology ($69.0 \pm 10.0\%$) and less viable fertilization (47.6 ± 20.5). In April/2017 the parameters evaluated by the semen one single neomale were similar to the semen of genotyping males. In the sampling carried out in June/2017, lower semen quality of neomales was observed, accentuating the differences between the evaluated groups. Differences in semen indicated that the hormonal treatment used for sex inversion affected sperm quality. However, neomales of *Rhamdia quelen* presented release of the semen and were able to perform fertilization of the oocytes and generate offspring.

Keywords: Aquaculture. CASA. Concentration. Fertilization rate. Sperm morphology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Concentração espermática analisada pelo método da câmara de Neubauer em setembro/2016. **A** – Neomacho. **B** – Macho genotípico. 46
- Figura 2.** Massa celular precipitada em relação ao volume total pelo método do espermatócrito em setembro/2016. **A** – Neomacho. **B** – Macho genotípico. 47
- Figura 3.** Comparação visual do sêmen de *Rhamdia quelen* em junho/2017. **A** – Machos genotípico. **B** e **C** – Neomachos. 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peso corporal (g), volume (mL) e produção relativa (mL.g⁻¹) de sêmen (média ± desvio padrão) de neomachos e machos genotípicos de *Rhamdia quelen*. A amplitude está apresentada entre parênteses. 45
- Tabela 2.** Variáveis espermáticas analisadas no sêmen de neomachos (n=3) e de machos genotípicos (n=3) de *Rhamdia quelen* (média ± desvio padrão) em setembro/2016. VCL = Velocidade curvilínea; VAP = Velocidade da trajetória média; VSL = Velocidade linear progressiva. LIN = Linearidade..... 46
- Tabela 3.** Variáveis espermáticas analisadas no sêmen de neomachos (n=2) e de machos genotípicos (n=8) de *Rhamdia quelen* (média ± desvio padrão) em abril/2017. VCL = Velocidade curvilínea; VAP = Velocidade da trajetória média; VSL = Velocidade linear progressiva. LIN = Linearidade..... 48
- Tabela 4.** Variáveis espermática analisadas no sêmen de neomachos (n=2) e de machos genotípicos (n=8) de *Rhamdia quelen* (média ± desvio padrão) em junho/2017. 48
- Tabela 5.** Anormalidades primárias (%) e secundárias (%) em neomachos e machos genotípicos, analisadas em setembro/2016 e junho/2017. 49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 <i>Rhamdia quelen</i>	21
1.2 CULTIVO DE LOTES MONOSSEXO.....	23
1.2.1 <i>Método direto</i>	25
1.2.2 <i>Método indireto</i>	26
1.3 ANÁLISE DO SÊMEN	27
1.3.1 <i>Volume</i>	28
1.3.2 <i>Concentração espermática</i>	28
1.3.3 <i>Espermatócrito</i>	29
1.3.4 <i>Morfologia espermática</i>	29
1.3.5 <i>Motilidade espermática</i>	30
1.3.5.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).....	30
1.3.6 <i>Integridade da membrana</i>	32
1.3.7 <i>Taxa de fertilização</i>	33
1.4 OBJETIVOS	33
1.4.1 <i>Objetivo geral</i>	33
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	34
1.5 JUSTIFICATIVA.....	35
2. ARTIGO ELABORADO	35
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
<i>Delineamento Experimental</i>	40
<i>Hipofisacção dos reprodutores e coleta do sêmen</i>	41
<i>Volume</i>	41
<i>Concentração espermática</i>	41
<i>Espermatócrito</i>	42
<i>Morfologia espermática</i>	42
<i>Motilidade espermática</i>	43

<i>Integridade da membrana</i>	43
<i>Taxa de fertilização</i>	44
<i>Análise Estatística</i>	44
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	
GERAL	63
APÊNDICES	77

1. INTRODUÇÃO GERAL

No estado de Santa Catarina, as tilápias (*Oreochromis* sp.) e as carpas perfazem mais de 70% da produção de peixes de água doce (EPAGRI/CEDAP, 2015). Porém, o cultivo de espécies exóticas pode gerar impactos negativos como predação, competição por recursos e alterações ambientais, caso ocorra seu escape no ambiente natural (ATTAYDE et al., 2007; BARBIERI et al., 2007; TROCA e VIEIRA, 2012).

Por outro lado, o cultivo de espécies nativas de uma mesma bacia hidrográfica, minimiza os riscos para os ecossistemas, e além desta vantagem, os animais estão mais adaptados às condições climáticas e ambientais, o que favorece o seu cultivo.

Entre as espécies nativas da região sul do Brasil, *Rhamdia quelen* apresenta características apropriadas para cultivo, como crescimento acelerado e aceitabilidade no mercado consumidor e diversas pesquisas vêm sendo realizadas com esta espécie, inclusive para a produção de lotes monossexo (WEISS, 2016), com o intuito de aumentar a produção da espécie no cenário dulcícola catarinense.

1.1 *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) é uma espécie de peixe teleósteo de água doce, nativa da América do Sul, que pertence à ordem Siluriformes, família Heptapteridae, sendo popularmente conhecida como jundiá (PERDICES et al., 2002).

Segundo Chippari-Gomes (1998), o jundiá é euritérmico, suportando ampla variação de temperatura, alevinos aclimatados a 31 °C podem suportar temperaturas entre 15 e 34 °C, mas quando aclimatados a temperaturas mais baixas apresentam maior tolerância à redução na temperatura.

Com relação aos aspectos reprodutivos, o jundiá atinge a maturidade sexual no primeiro ano de vida, sendo que no ambiente natural apresenta picos reprodutivos no verão e na primavera (GOMES et al., 2000). Machos da espécie iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4 cm e fêmeas com 16,5 cm e a partir de 16,5 e 17,5 cm todos os exemplares, machos e fêmeas, respectivamente estão potencialmente aptos para a reprodução (NARAHARA et al., 1985).

O desenvolvimento dos ovócitos de *R. quelen* ocorre de forma assincrônica, com amadurecimento em lotes que são liberados em intervalos regulares durante todo, ou parte, do ano, caracterizando

desovas parceladas (GHIRALDELLI et al., 2007). Fêmeas maduras apresentam o orifício genital avermelhado e dilatação ventral (GOMES et al., 2000). Machos aptos para a espermiacção liberam com facilidade um sêmen de aspecto branco e leitoso quando o abdômen próximo ao orifício sexual é pressionado. No entanto, fora das estações de desova, a quantidade de sêmen liberada reduz e a liberação só ocorre sob forte pressão abdominal (GOMES et al., 2000; BORGES, 2005).

Em condições de cultivo, durante os primeiros meses de vida (aproximadamente 150 dias após a eclosão), machos e fêmeas apresentam crescimento acelerado e similar (BALDISSEROTTO, 2004). Após esse período, os machos passam a maturar precocemente em relação às fêmeas (GHIRALDELLI et al., 2007), destinando grande parte de sua energia para o desenvolvimento de gônadas. Nas fêmeas, porém, esse processo é mais tardio, o que torna seu crescimento superior ao dos machos e produz heterogeneidade de tamanho durante o ciclo de produção (BALDISSEROTTO, 2004).

Esse desenvolvimento precoce dos machos faz com que a produção de sêmen ocorra em um momento inicial em que as fêmeas ainda não estão aptas para a reprodução. Ao final do período, no entanto, quando facilmente se encontram fêmeas prontas para o processo de indução hormonal, observou-se redução na proporção de machos liberando sêmen, bem como na quantidade de sêmen produzido por indivíduo (CARNEIRO et al., 2006).

Na região Sul do Brasil o cultivo de *R. quelen* tem aumentado devido a algumas características da espécie, como resistência ao manejo, eficiência alimentar e crescimento acelerado inclusive no inverno, quando ocorrem baixas temperaturas (FRACALOSSO et al., 2004; MONTANHA et al., 2011; EPAGRI/CEDAP, 2012).

De forma geral, o jundiá apresenta adaptação às diferentes condições de cultivo, facilidade para a produção de larvas por reprodução induzida, ganho de peso acelerado, carne com sabor agradável ao paladar e boa aceitação pelo mercado consumidor local (FRACALOSSO et al., 2004; BORGES, 2005; BALDISSEROTTO e RADÜNZ, 2005; GRAEFF et al., 2008; PAMPLONA, 2009).

No estado de Santa Catarina, o cultivo de jundiá apresentou destaque na produção aquícola de água doce em 2007, devido ao avanço das técnicas de cultivo aplicadas (EPAGRI/CEDAP, 2012), e desde então vem se tornando cada vez mais difundido entre os produtores catarinenses, se estabelecendo como uma das principais espécies de peixes produzidas no estado (EPAGRI, 2017).

Em 2012, a produção do jundiá (1,9%), foi apresentada separada da produção dos demais bagres, devido à importância que atingiu nos últimos anos, ficando atrás somente dos grupos de espécies exóticas, como a tilápia nilótica e as carpas (EPAGRI/CEDAP, 2013).

No ano de 2011, uma rede de pesquisa denominada Rede Jundiá, composta por instituições de pesquisa do sul do Brasil, foi criada com o objetivo principal de gerar conhecimentos e tecnologia para o cultivo do jundiá (AMARAL-JUNIOR, 2013; BARCELLOS et al., 2013).

O trabalho desta rede, permitiu que a produção desta espécie aumentasse de 644.739 kg produzidos em 2012, para 846.804 kg em 2014, que correspondeu a 2,10% do total produzido, apresentando destaque como o bagre mais cultivado no estado (EPAGRI/CEDAP, 2013; 2015).

Dados mais recentes de produção mostram que no ano de 2015 a safra de peixes de água doce cultivados em Santa Catarina foi de 42.774.744 kg, sendo que o jundiá manteve sua importante colaboração com 739.272 kg (EPAGRI/CEDAP, 2015).

1.2 CULTIVO DE LOTES MONOSSEXO

O cultivo de lotes monossexo de peixes é realizado comercialmente no intuito de explorar características associadas ao sexo fenotípico de maior interesse zootécnico, o que proporciona alta rentabilidade na produção das espécies (REIS et al., 2016).

Em tilápias (*Oreochromis niloticus*), o cultivo monossexo de machos é necessário para o aumento da produção (LIMA, 2011; BOMBARDELLI et al., 2007; ABRUNHOSA, 2011), visto que as fêmeas apresentam menor crescimento, ganho de peso e conversão alimentar que os machos por apresentarem maturação sexual precoce e elevada prolificidade (BOMBARDELLI et al., 2004; ZANONI et al., 2013; REIS et al., 2016).

No cultivo de bagres-do-canal (*Ictalurus punctatus*), a produção de lote monossexo masculino, também está relacionada ao maior crescimento dos machos em relação às fêmeas (CESAR et al., 2005), que pode ser de 10 a 30% superior (DUNHAM et al., 2001).

Por outro lado, em salmonídeos, são os machos que maturam precocemente e deste modo o cultivo monossexo feminino é utilizado pelo maior crescimento apresentado por fêmeas. Como ao longo do período de maturação sexual também ocorre significativa deterioração da qualidade da carne, as fêmeas tendem a apresentar carne de qualidade

superior à dos machos (LEE et al., 2004; TARANGER et al., 2010; REIS, 2015).

Outras características fenotípicas associadas ao sexo também justificam a produção de lotes monossexo (REIS, 2015): para a carpa comum (*Cyprinus carpio*) a produção de fêmeas visa à obtenção de ovas para consumo (KOCOUR et al., 2003; ROTHBARD, 2006), enquanto que em peixes ornamentais, como o *Betta splendens* e “guppy” *Poecilia reticulata*, o interesse pela produção de linhagens monossexo de machos deve-se à presença de nadadeiras de visual mais atrativo e/ou de coloração mais intensa (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2002; BATISTA et al., 2013).

Para a produção de lotes monossexo de peixes diferentes técnicas podem ser utilizadas: manipulação gênica, como ginogênese e triploidia (TEBALDI e AMARAL-JUNIOR, 2009), hibridização (TURRA et al., 2010) e reversão sexual, pelo efeito da temperatura (DRUMMOND, 2007; ZANONI et al., 2013) ou pelo uso de esteroides sexuais (BEZERRA, 2007; ZANARDI et al., 2011).

A técnica de reversão sexual utilizando o tratamento com hormônios é a mais utilizada comercialmente para obtenção de lotes monossexos de peixes, para a qual podem ser utilizados o método direto, realizado em uma única etapa, ou o indireto, que pode ser realizado em duas ou mais etapas (REIS, 2015).

Em piscicultura a reversão sexual tem sido rotineiramente empregada em tilápia (DIAS-KOBERSTEIN et al., 2007), salmão (*Salmo salar*) (LEE et al., 2004), truta (*Oncorhynchus mykiss*) (RAZMI et al., 2011) e carpa-comum (*Cyprinos-carpio*) (GROZEA et al., 2007).

No Brasil não se tem espécies nativas para as quais, são produzidos lotes monossexo comerciais. Esse cenário se deve, em grande parte, à falta de identificação correta e metodológica das diferenças fenotípicas, com potencial econômico, entre machos e fêmeas nas espécies produzidas no país (REIS et al., 2016). No entanto, pesquisas vem sendo realizadas com monossexo feminino do tambaqui *Colossoma macropomum* (EMBRAPA, 2015) e do cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (VALENTIN, 2013).

Em relação ao *R. quelen*, Baldisseroto e Radünz (2005), descreveram que as fêmeas crescem de 20-30% mais que os machos e, por essa razão, o cultivo monossexo feminino poderia ser utilizado para aumentar a produção desta espécie.

1.2.1 Método direto

A manipulação de gametas, ovos e embriões pode ser realizada com maior facilidade em peixes, por apresentarem fecundação e desenvolvimento externos, o que favorece o controle do sexo fenotípico, através da adição hormonal (TOLEDO-FILHO et al., 1996).

Na fase inicial da embriogênese os embriões não têm o sexo definido fenotipicamente, possuindo apenas as células germinativas primordiais, precursoras biológicas dos ovários e dos testículos.

Ao longo do desenvolvimento embrionário, um sinal químico originário de um gene ou de um conjunto de genes será responsável por informar ao tecido totipotente em que direção, macho ou fêmea, se desenvolver (SANTOS e SILVA, 1998).

O método direto consiste na aplicação de hormônio durante as fases iniciais de desenvolvimento larval de determinadas espécies para a produção de sexo fenotípico desejado (BOMBARDELLI et al., 2007). Assim, se um peixe receber tratamento hormonal durante o período que o sexo fisiológico pode ser alterado ocorrerá interferência direta no desenvolvimento das células totipotentes (CESAR et al., 2005).

Entre os hormônios mais utilizados na reversão sexual direta estão o andrógeno 17α -metiltestosterona, para a masculinização e o estrógeno 17β -estradiol para a feminilização (BOMBARDELLI et al., 2004; CNAANI e LEVAVI-SIVAN, 2009), ambos ministrados por via oral pela incorporação na ração (MEURER et al., 2008), por banho de imersão (ZANARDI et al., 2011), por injeção ou por implantes (PANDIAN, 2013).

Com o intuito de feminilizar *R. quelen*, Amaral-Junior et al. (2008a), utilizaram doses de 90, 100 e 110 mg/kg do hormônio 17β -estradiol incorporado na dieta e ministrado durante os primeiros 21 dias de larvicultura. Os autores verificaram que na dose de 100 mg/kg foi encontrada maior proporção de fêmeas (79,4%).

Doses de 105 e 115 mg/kg aplicadas à ração, também foram testadas para o jundiá, tendo sido obtidos, respectivamente, 100% e 87,5% de feminilização (AMARAL-JUNIOR et al., 2008b).

No entanto, apesar do método direto ser considerado vantajoso por ser simples e rápido, em alguns países europeus existe restrição para a comercialização e consumo de peixes tratados com esteroides (REIS et al., 2016).

No Brasil, Zanardi et al. (2011) registraram concentrações inferiores a 2,0 mg/Kg de 17α -metiltestosterona em carcaças de tilápias submetidas a tratamento hormonal com concentrações de 6,0 e 60

mg/Kg, em banho de imersão e em via oral, respectivamente, concentrações preconizadas pelo Codex Alimentarius do Brasil como seguras para o consumo.

Todavia, o método direto aumenta também os riscos de contaminação da água e do solo (VALENTIM, 2013), sendo necessária alta qualificação de funcionários para a manipulação e o manejo do hormônio (REIS, 2015).

Amorin (2013) avaliou o sedimento de tanques de piscicultura de tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) e encontrou deposição de 17 α -metiltestosterona naqueles onde foi ministrada ração com hormônio para os peixes. O autor preconizou como importante a avaliação dos sedimentos nos locais de despejo dessas águas, a fim de se verificar o acúmulo de metiltestosterona e prever níveis de contaminação que possam causar desequilíbrio ecológico.

1.2.2 Método indireto

Uma solução alternativa para a produção de lotes monossexo livres de hormônio é a reversão sexual indireta, na qual o processo hormonal é realizado apenas no plantel de reprodutores (MOTA, 2013).

O uso do método indireto é possível ser aplicado em sistema de determinação sexual, que deve ser obrigatoriamente cromossômico simples do tipo XX/XY ou ZW/ZZ (TOLEDO-FILHO et al., 1996; PIFERRER, 2001).

No caso do tipo XX/XY, para a obtenção de lotes femininos são necessárias duas etapas, sendo, a primeira a masculinização de fêmeas genotípicas com hormônio andrógeno, originando neomachos (fêmeas genotípicas masculinizadas, apresentando fenótipo masculino) e a segunda a fertilização de ovócitos normais com o sêmen de neomachos (ISLER, 2009; BORGES, 2015).

Dessa forma, ao se cruzar fêmeas masculinizadas (XX) com fêmeas normais (XX), será produzida, teoricamente, descendência 100% feminina (ISLER, 2009; REIS, 2015).

Ainda que utilize mais tempo, por envolver duas gerações, a via indireta, tem maior valor em termos de aplicação em países onde o uso de hormônio não é permitido, uma vez que os peixes submetidos ao tratamento hormonal são em número reduzido e utilizados apenas como reprodutores (TABATA, 2000).

A produção de lotes monossexo femininos, pelo método indireto tem sido muito utilizada em escala comercial no cultivo de

truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) no Reino Unido (BYE e LINCOLN, 1986) e de salmão no Canadá (DONALDSON, 1996).

Para o jundiá a aplicação da reversão sexual indireta foi conduzida por Weiss (2016). Naquele estudo, a masculinização de fêmeas genótípicas foi realizada utilizando diferentes doses de 17 α -metiltesterona por via oral, e por testes de progênie foi possível a identificação de três neomachos, que submetidos ao cruzamento geraram progênies compostas, em média por 80,06% (\pm 7,46%) de fêmeas.

Todavia, neomachos de algumas espécies podem apresentar dificuldade para reproduzir, devido a presença de gônadas com anomalias. Kowalski et al. (2011) ao compararem o potencial reprodutivo de neomachos (XX) com machos heterogaméticos (XY) de truta-arco-íris (*O. mykiss*) verificaram que os testículos de neomachos apresentavam células de Sertoli hipertrofiadas, prejudicando a função secretora. Apesar de diferenciar histologicamente dos testículos de machos normais, os espermatozoides dos neomachos apresentaram maturação completa e taxa de motilidade semelhante ao dos machos genóticos 73,1 e 73,7%, respectivamente (KOWALSKI et al., 2011), indicando a viabilidade do sêmen.

No caso da truta-arco-íris, os dutos espermáticos de neomachos não se desenvolvem adequadamente, o que faz com que o sêmen seja obtido após a eutanásia do animal e posterior esmagamento dos testículos (FERNÁNDEZ-DÍEZ, 2013 apud ROBLES et al., 2003).

De modo contrário, Rodina et al. (2008) registraram baixa velocidade, baixa motilidade e conseqüentemente baixa taxa de fertilização do sêmen de neomachos de *Perca fluviatilis* L.

Para o *R. quelen*, os resultados de Weiss (2016) mostraram ser possível a reprodução dos neomachos. No entanto, ainda não existem estudos sobre qualidade do sêmen desses animais, informação que apresenta grande importância para identificação do potencial reprodutivo desses animais.

1.3 ANÁLISE DO SÊMEN

Para a descrição de um perfil espermático que apresente as características físicas do sêmen, normalmente são analisados o volume, a motilidade, o vigor e a concentração espermática (ROUTRAY et al., 2007). Entretanto, segundo Rurangwa et al. (2004), a qualidade do sêmen também pode ser avaliada pela viabilidade espermática, pelas

características morfológicas dos espermatozoides e/ou pela composição química do plasma seminal.

Estudos realizados sobre a qualidade do sêmen em peixes têm demonstrado características seminais muito variadas entre as espécies e entre os indivíduos nos parâmetros avaliados (MOJICA, 2004; LENZ, 2014).

Nesse sentido, a avaliação das características seminais é necessária para caracterizar qualitativamente e quantitativamente o sêmen dos reprodutores, permitindo a seleção de sêmen de melhor qualidade para ser submetido ao processo de fertilização dos ovócitos ou criopreservação (ROUTRAY et al., 2007; CABRITA et al., 2010; LENZ, 2014).

Em reprodutores neomachos de peixes, a análise seminal também é necessária para determinação da qualidade e do potencial reprodutivo. Velez e Elizabeth (2010), ao analisar o sêmen de machos normais de truta-arco-íris e o sêmen de fêmeas masculinizadas, utilizaram o volume, a motilidade e a taxa de fertilização, como alguns dos parâmetros de avaliação.

1.3.1 Volume

O volume de sêmen produzido pelos peixes é uma medida quantitativa muito variável, que pode ser influenciada pela estação do ano, tamanho do indivíduo, clima, período sexual e método de coleta (BOMBARDELLI et al., 2006).

Variações do volume seminal também podem ser observadas para a maioria das espécies de peixes que recebem tratamento hormonal, que resulta em significativo aumento do volume (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Shiro Jr. (2013) descreveu que a maioria dos peixes de couro produzem maior volume de sêmen que os peixes de escama.

Todavia, o volume do sêmen não tem um valor biológico intrínseco, e sim está relacionado à quantidade de células fecundantes nele contidas, sendo importante para a diluição do material fecundante no processo de reprodução artificial (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

1.3.2 Concentração espermática

A concentração espermática pode variar de acordo com o peso e a idade do peixe, época do ano (SILVA et al., 2009), frequência de coleta e com o próprio volume ejaculado (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

No processo de reprodução induzida a determinação da concentração espermática constitui importante passo para a otimização do sêmen, evitando a utilização de uma quantidade maior de espermatozoides do que a necessária para que ocorra a fertilização (SHIMODA, 2004; LENZ, 2014).

1.3.3 Espermatócrito

O espermatócrito é medido em função do volume proporcional das frações de espermatozoides precipitadas por centrifugação e tem sido utilizado como um método alternativo para o cálculo da concentração sendo que, de modo geral, quanto maior a concentração espermática maior será o espermatócrito (SHIMODA et al., 2007).

Para o jundiá, foi observada relação linear entre a concentração quantificada em câmara de Neubauer e o espermatócrito, sugerindo que a concentração espermática do sêmen pode ser estimada pelo método do espermatócrito, cuja análise é mais rápida e prática (SANCHES et al., 2011a).

1.3.4 Morfologia espermática

Dentre os parâmetros que expressam a qualidade do sêmen, a morfologia normal das células espermáticas é um dos fatores mais importantes para que o espermatozoide seja considerado viável e potencialmente fértil (STREIT JR. et al., 2009; ARRUDA et al., 2011).

Diversos fatores podem influenciar a morfologia dos espermatozoides de peixes, tais como: nutrição (MATAVELI et al., 2007), idade do reprodutor (GASPARINI et al., 2010), indução hormonal e o método de coloração para a análise morfológica (STREIT JR. et al. 2004; TUSET et al., 2008).

Segundo Arruda et al. (2011), a alta frequência de espermatozoides morfológicamente anormais pode diminuir a motilidade, o que reduz a fertilização. No entanto, para peixes não existem índices morfológicos que indiquem a viabilidade dos reprodutores (MELO-MACIEL et al., 2012).

Para mamíferos, a exemplo de bovinos e suínos, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) preconiza como impróprios para a reprodução amostras seminais com taxa inferiores a 70% de normalidade.

De acordo com Miliorini (2006), defeitos morfológicos de cauda enrolada e degenerada podem comprometer a fertilização e taxas

de fertilização superiores podem estar relacionadas a maiores durações de motilidade, devido à prolongada capacidade de movimentação das células espermáticas.

1.3.5 Motilidade espermática

A motilidade é um parâmetro quantitativo, que de forma similar à morfologia se apresenta como um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen em peixes (SOLIS-MURGAS et al., 2011), sendo apontada como uma importante ferramenta na seleção de um ejaculado (VERSTEGEN et al., 2002; MATOS et al., 2008), pois representa a taxa de espermatozoides móveis (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

De modo geral, a motilidade espermática tem sido avaliada subjetivamente através de microscopia óptica, na qual a motilidade total é classificada de 0 a 100% (SOARES et al., 2010).

Outra forma de se estimar a motilidade é através do tempo de duração da motilidade, que representa o tempo em que se perde a movimentação de 50% (SANCHES et al., 2006; SANCHES et al., 2009a; SANCHES, 2009b) 90% (SOLIS-MURGAS et al., 2004) ou 100% dos espermatozoides (STREIT JR. et al., 2006; 2009).

No entanto, estudos apontam que este tipo de análise é impreciso, resultando em variações de até 60% mesmo quando executada por investigadores experientes. Para reduzir a subjetividade, sistemas automáticos de análise seminal vêm sendo desenvolvidos (MATOS et al., 2008; ARRUDA et al., 2011).

1.3.5.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

O método computadorizado de análise de sêmen, ou CASA, “computer assisted sperm analysis”, foi inicialmente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de mamíferos (principalmente de humanos, bovinos e suínos) e de aves, tendo aplicação mais recente em estudos com peixes (RURANGWA et al., 2001; VERSTEGEN et al., 2002).

Embora seu uso não esteja inteiramente padronizado para todas as espécies de peixes, atualmente tem sido considerado o método mais relevante em pesquisas sobre reprodução (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

O CASA é um sistema utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas

e significativas do movimento individual de cada célula, bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004).

Programas computadorizados usados para a avaliação espermática são menos subjetivos e propiciam maior repetitividade às observações do que a habilidade do técnico em identificar padrões de motilidade espermática (CAVALCANTE et al., 2005), sendo possível avaliar objetivamente a porcentagem de espermatozoides móveis e fornecer as velocidades da movimentação do espermatozoide (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

Para análise da motilidade, o CASA captura imagens sucessivas, identificando os pontos onde os espermatozoides se encontram a cada imagem. A partir das imagens digitalizadas da trajetória de cada célula espermática, o programa analisa as propriedades de trajetória e velocidade dos espermatozoides, calculando o percurso total pelas retas traçadas entre esses pontos (LOOK et al., 2001; SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

A motilidade espermática é comumente considerada uma das mais importantes características para a avaliação do potencial de fertilidade do espermatozoide. Dessa forma, os parâmetros de motilidade espermática apresentados pelo programa, como porcentagem de espermatozoides móveis e velocidade curvilínea, poderiam prever o potencial reprodutivo de um indivíduo por estarem diretamente relacionados à taxa de fertilização (NASCIMENTO, 2008).

De acordo com Verstegen et al. (2002), além da taxa de motilidade, os parâmetros calculados pelo CASA são:

- I. Velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$): Velocidade da trajetória real do espermatozoide;
- II. Velocidade linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$): Velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide.
- III. Velocidade média da trajetória (VAP - $\mu\text{m/s}$): Velocidade da trajetória média do espermatozoide. Em casos onde 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.

IV. Linearidade (LIN - %): Relação percentual entre VSL e VCL, descreve o percentual de movimento linear.

Correlações positivas entre os parâmetros acima apresentados e a capacidade de fertilização, já foram relatadas para algumas espécies de peixes, para as quais o sistema CASA já foi testado (RURANGWA et al., 2004).

Algumas espécies de peixes já tiveram a motilidade dos espermatozoides avaliado através do CASA, podendo ser citadas: pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (NASCIMENTO et al., 2010; MELO, 2010), curimba (*Prochilodus lineatus*) (NASCIMENTO, 2008; VIVEIROS et al., 2010); curimatã comum (*Prochilodus brevis*) (LOPES et al., 2014); surubim-do-Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) (ARAÚJO, 2011); tambaqui (*C. macropomun*) (VIEIRA, 2010; CAVALCANTE, 2014); bagre africano (*Clarias gariepinus*) (RURANGWA et al., 2001); carpa (*C. carpio*) (LINHARES et al., 2012); piabanha (*Brycon insignis*) (SHIMODA, 2004) e pintado (*P. corruscans*) (VELARDE, 2013).

Para o *R. quelen*, também encontra-se na literatura trabalhos utilizando o sistema CASA para avaliar a motilidade (SANCHES, 2009b; SANCHES et al., 2010a,b).

Assim, devido às vantagens apresentadas pelo programa, o presente trabalho utilizará o CASA como ferramenta para a avaliação da motilidade dos espermatozoides de neomachos e de machos de *Rhamdia quelen*, a fim de se produzir maior confiabilidade nos resultados.

1.3.6 Integridade da membrana

A integridade da membrana (FAUVEL et al., 2010; SHIRO JR., 2013), também conhecida como taxa de sobrevivência (CARNEIRO et al., 2006) ou índice de sobrevivência (BOMBARDELLI et al., 2006; SANCHES et al., 2011b). Ela avalia a capacidade de penetração de corantes no espermatozoide, e serve como indicador da porcentagem de espermatozoides íntegros e não íntegros, considerados respectivamente como vivos e mortos.

Geralmente para a avaliação da integridade utiliza-se uma solução de eosina e nigrosina, que penetra os espermatozoides não íntegros, enquanto espermatozoides íntegros não são corados (KAVAMOTO e FOGLI DA SILVEIRA, 1986).

Segundo Zaniboni-Filho e Baldisseroto (2015), quando ocorre morte celular há alteração da permeabilidade da membrana para

determinados íons e o uso de corantes específicos aplicados sobre o sêmen permite identificar a integridade dos espermatozoides.

Recentemente, outras técnicas têm sido utilizadas na avaliação da integridade da membrana, como marcadores de DNA (ácido desoxirribonucleico) fluorescentes por citometria de fluxo que apresenta maior precisão e rapidez (FAUVEL et al., 2010).

1.3.7 Taxa de fertilização

A taxa de fertilização é comumente utilizada para estimar o número de ovos viáveis em porcentagem de ovos que atingem a fase de fechamento do blastóporo (FELIZARDO, 2008), que ocorre nos peixes aproximadamente dez horas após a fertilização (ZANIBONI-FILHO, 1992).

Para Bobe e Labbé (2010) e Fauvel et al. (2010), a qualidade do sêmen é melhor definida pela capacidade em fertilizar com sucesso um ovócito. Mas, segundo Rurangwa et al. (2004) e Nascimento (2008) a mensuração indireta da qualidade do sêmen, apenas pela capacidade de fertilização pode não ser segura, se a qualidade dos ovócitos for variável a ponto de interferir no sucesso da fertilização.

Dessa forma, a taxa de fertilização deve ser avaliada juntamente com outros parâmetros da qualidade do sêmen, considerando que eles podem influenciar a fertilização. Segundo Silva et al. (2009), nenhum teste isoladamente é capaz de medir a qualidade de uma amostra de sêmen, sendo necessário avaliar diferentes aspectos para predizer o potencial de fertilidade de um macho.

Todavia, a análise da fertilização, também permite confirmar a efetividade da avaliação subjetiva ou objetiva da motilidade espermática (NASCIMENTO, 2008), reiterando a importância da análise conjunta dos parâmetros espermáticos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Caracterizar a qualidade do sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o volume e a concentração do sêmen, a morfologia, e a integridade da membrana dos espermatozoides e o espermatócrito;
- Analisar a motilidade dos espermatozoides pelo sistema CASA;
- Avaliar a taxa de fertilização;
- Comparar a qualidade do sêmen de neomachos com a de machos normais.

1.5 JUSTIFICATIVA

No cultivo do Jundiá (*Rhamdia quelen*) os machos, durante a fase de engorda, apresentam menor crescimento do que as fêmeas porque entram em maturação precocemente. Sendo assim, a produção de fêmeas é economicamente mais vantajosa devido ao maior crescimento apresentado por fêmeas durante a engorda.

Uma das técnicas disponíveis para se obter lotes femininos de *R. quelen* livres de hormônios exógenos é o cruzamento de fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genotípicas) com neomachos (fêmeas genotípicas masculinizadas), técnica conhecida como reversão sexual indireta.

No entanto, neomachos de algumas espécies de peixes não formam gônadas com desenvolvimento completo, sendo incapazes de liberar sêmen, ou apresentam sêmen de baixa qualidade.

Os neomachos de *R. quelen* produzidos por Weiss (2016), entretanto, liberaram sêmen durante a reprodução induzida.

Como não existem informações sobre a qualidade seminal de neomachos de *R. quelen*, estudos dos parâmetros de qualidade do sêmen de neomachos de jundiá fazem-se necessários, pois permitem avaliar o potencial reprodutivo e colaboram para produzir informações para o cultivo desta espécie que apresenta relevante importância econômica para o estado de Santa Catarina.

2. ARTIGO ELABORADO

O artigo científico “Caracterização do sêmen de neomachos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)”, elaborado nesta dissertação, está redigido nas normas do Boletim do Instituto de Pesca (Qualis B2; fator de impacto no JCR 0,525).

<http://www.pesca.sp.gov.br/index.php/publicacoes/boletim-do-instituto-de-pesca>.

Artigo

Caracterização do sêmen de neomachos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a qualidade do sêmen de neomachos de jundiá, *Rhamdia quelen*, através de parâmetros qualitativos e quantitativos. O sêmen foi coletado e caracterizado por meio do volume e concentração do sêmen, motilidade, morfologia e integridade dos espermatozoides, espermátócrito e taxa de fertilização e posteriormente comparado ao sêmen de machos genotípicos utilizando análise estatística. Na coleta realizada em setembro/2016, neomachos apresentaram qualidade do sêmen similar à de machos genotípicos, mas apresentaram espermatozoides com menor porcentagem de células ($p < 0,05$) com morfologia normal ($69,0 \pm 10,0\%$) e menos viáveis a fertilização ($47,6 \pm 20,5$). Em abril/2017 os parâmetros avaliados pelo sêmen de um único neomacho foram similares ao sêmen de machos genotípicos. Na coleta realizada em junho/2017 foi observada menor qualidade do sêmen de neomachos, acentuando as diferenças entre os grupos avaliados. Diferenças encontradas no sêmen indicaram que o tratamento hormonal usado para a inversão do sexo afetou a qualidade dos espermatozoides. No entanto, neomachos de *Rhamdia quelen* apresentaram liberação do sêmen e foram capazes de realizar a fecundação dos ovócitos e gerar descendentes.

Palavras-chave: CASA. Concentração. Morfologia de espermatozoides. Taxa de fertilização. Volume.

Article

Characterization of semen of neomales de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Abstract

The objective of this study was to characterize the semen quality of jundiá neomales, *Rhamdia quelen*, through qualitative and quantitative parameters. Semen was collected and characterized by the volume and concentration of semen, motility, morphology and sperm integrity, spermatocrit and fertilization rate and later compared to semen of genotypic males using statistical analysis. In the sampling made in September/2016, neomales presented semen quality similar to that of genotypic males, but presented spermatozoa with a lower percentage of cells ($p < 0.05$) with normal morphology ($69.0 \pm 10.0\%$) and less viable fertilization (47.6 ± 20.5). In April/2017 the parameters evaluated by the semen one single neomale were similar to the semen of genotyping males. In the sampling carried out in June/2017, lower semen quality of neomales was observed, accentuating the differences between the evaluated groups. Differences in semen indicated that the hormonal treatment used for sex inversion affected sperm quality. However, neomales of *Rhamdia quelen* released semen and were able to perform fertilization of the oocytes and generate offspring.

Keywords: CASA. Concentration, Fertilization rate. Sperm morphology. Volume.

INTRODUÇÃO

O crescimento heterogêneo de machos e de fêmeas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), compromete o cultivo da espécie, pois os machos crescem menos que as fêmeas (BALDISSEROTO, 2004). Desse modo, o cultivo monossexo de fêmeas pode vir a ser uma alternativa para a produção de lotes mais homogêneos e para intensificar a produção desta espécie (AMARAL-JUNIOR, 2008), que vem crescendo na região Sul do Brasil, por ser uma espécie nativa que apresenta bom desempenho produtivo, adaptabilidade às condições climáticas e cujo processo reprodutivo em piscicultura está dominado (BOMBARDELLI et al., 2006; MONTANHA et al., 2011).

A reversão sexual indireta é uma técnica de produção de lotes monossexo de fêmeas, que consiste na masculinização de fêmeas genótípicas com hormônio androgênico, resultando em uma descendência com machos genotípicos e fêmeas invertidas, os chamados neomachos. Posteriormente é realizado o cruzamento dos neomachos com fêmeas normais, dando origem a uma descendência teoricamente 100% feminina, e livre de hormônios (REIS et al., 2016).

Todavia, há pouca informação disponível sobre a qualidade do sêmen de neomachos, principalmente de espécies nativas. Estudos mostram neomachos com gônadas apresentando estruturas atrofiadas (KOWALSKI, et al., 2011) ou produzindo sêmen de baixa qualidade (RODINA et al., 2008), o que poderia comprometer a reprodução.

Nesse contexto, a avaliação do sêmen dos neomachos é necessária para predizer o potencial reprodutivo e identificar a viabilidade do uso desses animais na reprodução comercial por meio da descrição do perfil espermático dos reprodutores e da avaliação da qualidade do sêmen coletado (SANCHES et al., 2011a,b).

Para a descrição de um perfil espermático, parâmetros qualitativos e quantitativos são utilizados na análise das características físicas do sêmen (ROUTRAY et al., 2007), sendo as principais o volume e a concentração do sêmen, a morfologia dos espermatozoides, a taxa de motilidade espermática e a integridade da membrana (SOLIS-MURGAS et al., 2011; MELO-MACIEL et al., 2012; ZANIBONI-FILHO e BALDISSEROTO, 2015), além da taxa de fertilização (BOBE e LABBÉ, 2010).

Entre os parâmetros mencionados, a motilidade apresenta influência relevante na fertilização. No intuito de reduzir a subjetividade nas análises de motilidade, sistemas automáticos como o CASA

(Computer Assisted Sperm Analysis) têm sido cada vez mais utilizados (MATOS et al., 2008; ARRUDA et al., 2011).

Os sistemas computadorizados fornecem dados precisos sobre as características do movimento espermático, o que possibilita a obtenção de informação da velocidade espermática de cada espermatozoide, por análise integrada de imagens digitalizadas (RURANGWA et al., 2001; AMANN e KATZ, 2004; ZANIBONI-FILHO e BALDISSEROTO, 2015).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen*, comparando-o com o sêmen de machos genotípicos, por meio dos principais parâmetros de qualidade do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

O presente estudo analisou, individualmente, o sêmen de neomachos e o sêmen de machos genotípicos de *Rhamdia quelen* em três momentos: setembro/2016, abril/2017 e junho/2017. Os neomachos de *R. quelen* utilizados nesse estudo foram produzidos por Weiss (2016), utilizando doses de 60, 90 ou 120 mg de 17α -metiltestosterona por kg de ração durante 21 dias, e identificados por teste de progênie.

Em setembro/2016 o sêmen de três neomachos ($481,7 \pm 265,8$ g) e o sêmen de três machos normais ($376,7 \pm 107,7$ g) foram individualmente caracterizados pelas variáveis: volume e concentração espermática, espermatócrito, morfologia espermática, motilidade e integridade da membrana dos espermatozoides, além da taxa de fertilização, seguindo-se os procedimentos estabelecidos no Protocolo PP00788, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFSC.

Após um período de seis meses (abril/2017), uma nova coleta de sêmen foi realizada, tendo sido coletado o sêmen dos três machos genotípicos utilizados em setembro/16 e o sêmen de outros cinco machos genotípicos, totalizando oito animais ($441,9 \pm 86,1$ g). Para neomachos, devido à morte de um dos animais, foram utilizados apenas dois neomachos ($357,5 \pm 123,7$ g).

Uma coleta complementar de sêmen foi realizada em junho/2017 utilizando os mesmos animais avaliados em abril/17, dois neomachos ($325,0 \pm 99,0$ g) e oito machos genotípicos ($418,1 \pm 77,4$ g), com a finalidade de melhor caracterizar o volume e a concentração do

sêmen, o espermátocrito, a morfologia dos espermatozoides e a integridade da membrana.

Nestes estudos todos os reprodutores neomachos e machos genotípicos eram irmãos e apresentavam idade aproximada de três anos.

Os peixes foram estocados em tanques de 1000 L ligados a um sistema de recirculação de água, com temperatura ($25,3 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,64$) e foto período (12 horas de luz) controlados, apresentando $7,0 \pm 0,73$ mg/L de oxigênio, $7,6 \pm 0,5$ de pH e $2,3 \pm 0,1$ g/L de salinidade, e foram alimentados com ração comercial (Guabi Pirá® de 2-4 mm) com 40% de proteína bruta, ofertada até a saciedade aparente duas vezes ao dia e três vezes por semana.

Hipofisacão dos reprodutores e coleta do sêmen

Seguindo os critérios de maturação das gônadas descritos por Woynarovich e Horvath (1980), os animais aptos para a reprodução foram induzidos com extrato pituitário de carpa (EPC), utilizando-se duas doses em fêmeas (0,5 e 4,5 mg/kg), com intervalo de 12 h e uma dose em neomachos e machos genotípicos (2,0 mg/kg) aplicada no momento da segunda dose das fêmeas.

Os gametas foram coletados com 220 horas-grau, após a aplicação da segunda dose, na temperatura da água de $24,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nos neomachos e nos machos genotípicos, o sêmen foi coletado individualmente até a redução aparente (SANCHES et al., 2011a) com o uso de seringas plásticas (SANCHES e CERQUEIRA, 2010), evitando-se a contaminação com água, sangue, fezes ou urina. Após a coleta as seringas foram armazenadas em caixas térmicas contendo gelo reutilizável. No momento da coleta avaliou-se a coloração e o aspecto do sêmen, de modo subjetivo, de acordo com Shiro Jr. (2013).

Volume

O volume foi aferido com o uso de seringa plástica de 5,0 mL (KAVAMOTO e FOGLI DA SILVEIRA, 1986). Posteriormente, o sêmen foi transferido para eppendorfs de 3,0 mL para a realização das análises.

Concentração espermática

Nesta análise uma alíquota de 10 μL de sêmen *in natura* foi diluída (1:100, sêmen:volume total) em solução de formol-citrato (2,9 g

de citrato de sódio, 4,0 mL de formaldeído a 35% e 100 mL de água destilada). Em amostras muito concentradas uma alíquota de 1,0 μL do volume foi novamente diluída em 999 μL (1:1000) para facilitar a contagem.

A concentração espermática foi determinada através da contagem do número de espermatozoides (espermatozoides/mL) em câmara hematimétrica de Neubauer (WIRTZ e STEINMANN, 2006). Na câmara de Neubauer foi adicionado 1,0 μL do sêmen diluído, sendo contados os espermatozoides presentes em cinco quadrículas, sendo a concentração calculada conforme CBRA (1998).

Espermatócrito

A mensuração do espermatócrito foi realizada com o sêmen fresco utilizando-se tubos capilares de micro-hematócrito, que foram preenchidos com aproximadamente 70% de sêmen e vedados em uma das extremidades.

Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 15 min, em uma microcentrífuga (centrífuga - CENTRIBIO Hematocrit®). O percentual de massa celular presente no sêmen foi mensurado com o auxílio de uma régua (SANCHES et al., 2011a).

Morfologia espermática

Inicialmente uma alíquota de 10 μL de sêmen foi diluída em solução de formol-citrato (1:100, sêmen:volume total). Posteriormente, a 1,0 μL desta solução diluída foram adicionados 40 μL de corante rosa bengala (STREIT JR. et al., 2004).

Para análise da morfologia dos espermatozoides, uma alíquota de 1,0 μL de sêmen corado foi colocada sobre lâmina para realização de esfregaço.

Depois de seco, o esfregaço foi observado em microscópio de luz (Leica® DM3000 LED, GER) para contagem (n=200) e a classificação dos espermatozoides em normais ou com presença de anormalidades, seguindo-se a metodologia descrita por Streit Jr. et al. (2008).

As anormalidades morfológicas foram classificadas em primárias, quando os espermatozoides apresentavam cauda dobrada, enrolada, curta, curvada e/ou dupla e cabeça pequena e/ou grande, ou

em secundárias, quando os espermatozoides apresentavam cauda tipo gancho, ausência de cabeça e/ou cauda solta.

Motilidade espermática

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema CASA, utilizando-se 1,0 μL de sêmen, que foi diluído em solução ativadora de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1,0%. Para os machos normais, a diluição foi de 1:1000 (sêmen/solução), e para os neomachos foi de 1:200, devido ao menor número aparente de células.

Na sequência, 10 μL do sêmen diluído foram colocados em câmara de Neubauer e a motilidade foi gravada em vídeos com duração de 60 s, a uma taxa de 100 quadros, utilizando-se um microscópio de luz (Leica[®] DM3000 LED, GER), equipado com uma câmera CCD com objetiva de contrastaste de fase (Leica[®] ICC50 HD) ligada a um microcomputador.

A gravação, a compilação das imagens e a análise dos vídeos produzidos no CASA utilizando o software Image J seguiu o protocolo proposto por Kime et al. (2001), já validado para *R. quelen* por Sanches et al. (2010a).

As variáveis avaliadas foram o percentual de motilidade (%), a velocidade curvilinear (VCL), a velocidade média de deslocamento (VAP), a velocidade em linha reta (VSL) e a Linearidade (LIN) no tempo de 10 s, sendo o procedimento realizado em triplicata para cada amostra de sêmen de neomachos e de machos.

Integridade da membrana

O percentual de espermatozoides com membrana celular íntegra foi quantificado pelo método de coloração eosina/nigrosina (3,0% e 5,0%, respectivamente), adaptado de BLOM (1950).

Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi corada com 50 μL de nigrosina e 30 μL de eosina e em seguida foi realizado um esfregaço com uma alíquota de 1,0 μL da mistura. O procedimento foi similar ao realizado por SANCHES et al. (2011b) tendo sido alteradas apenas as dosagens de sêmen (30 μL), dos corantes (90 μL) e do esfregaço (10 μL).

Em microscópio de luz (Leica[®] DMLB, GER), foram contados 200 espermatozoides, para os quais foram considerados como não íntegros aqueles cujas células apresentaram coloração rosada, ou seja, que absorveram os corantes, e como íntegros os que apresentaram

células não coradas, cujas membranas íntegras impediam a penetração dos corantes, com adaptações de Kavamoto e Fogli da Silveira (1986).

Taxa de fertilização

Em setembro de 2016, para cada sêmen de neomachos e de machos genotípicos foram utilizados 2,0 g de ovócitos de uma fêmea (830 g) de *R. quelen*, cujo os ovócitos, após coleta manual foram fertilizados por uma alíquota de 50 µL de sêmen proveniente de cada reprodutor.

Em abril de 2017, a taxa de fertilização foi novamente realizada utilizando o sêmen dos reprodutores neomachos e machos genotípicos para fecundar os ovócitos de uma única fêmea (1310 g).

O procedimento de fertilização foi realizado em triplicata com o sêmen individual de cada animal e os ovos, após a fertilização, foram distribuídos em incubadoras cilíndrico-cônicas de 10 L abastecidas por um sistema de recirculação de água com temperatura de 25 °C.

A taxa de fertilização dos cruzamentos envolvendo neomachos e os machos, nos meses de setembro e abril, foi quantificada dez horas após a fecundação, através da amostragem de 260 ovos (ZANIBONI-FILHO, 1992) de cada incubadora que foram observados em microscópio estereoscópico (Leica® MZ12, GER), considerando-se como viáveis, os ovos em estágio de fechamento do blastóporo completo (ZANIBONI-FILHO, 1992; CAROLSFELD et al., 2003).

Análise Estatística

As variáveis espermáticas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney, aplicado para comparação de neomachos e machos genotípicos de *R. quelen*. Os dados referentes aos parâmetros espermáticos foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade (LOPES et al., 2014).

Para verificação de possíveis relações entre as concentrações espermáticas determinadas em câmara de Neubauer e pelo espermatócrito, os resultados desses parâmetros para neomachos e machos genotípicos foram submetidos à análise de regressão linear, ao nível de 5,0% de significância (SANCHES et al., 2011a).

A análise de regressão, também foi usada para avaliar a relação de dependência da taxa de fertilização em relação à morfologia de neomachos e machos genotípicos.

RESULTADOS

O peso corporal dos animais, o volume seminal obtido e a produção relativa de sêmen produzido por neomachos e machos genotípicos de *R. quelen* nas três coletas realizadas estão apresentados na Tabela 1.

O volume de sêmen produzido por neomachos em setembro/2016 não apresentou diferença em relação ao volume produzido por machos genotípicos ($p > 0,05$), mas a amplitude mostra uma variação no volume liberado de sêmen nos neomachos em relação aos machos. A produção de sêmen em relação ao peso dos animais foi superior em machos em set/2016.

Os valores das demais variáveis analisadas para o sêmen de neomachos e machos genotípicos de *Rhamdia quelen* em setembro/2016 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Peso corporal (g), volume (mL) e produção relativa de sêmen (mL.g^{-1}) (média \pm desvio padrão) de neomachos e machos genotípicos de *Rhamdia quelen*. A amplitude está apresentada entre parênteses.

Período	Tipo	n	Peso (g)	Sêmen	
				Volume (mL)	Produção (mL.g^{-1})
Setembro 2016	Neomachos	3	481,7 \pm 265,8 (270 – 780)	3,7 \pm 4,4 (1,1 - 8,8)	0,01 \pm 0,02 (0,002 - 0,03)
	Machos	3	376,7 \pm 107,7 (265 – 480)	10,0 \pm 2,0 (7,8 - 11,8)	0,03 \pm 0,002 (0,02 - 0,03)
Abril 2017	Neomachos	2	357,5 \pm 123,7 (270 – 445)	8,0 ¹	0,03
	Machos	8	441,9 \pm 86,1 (375 – 575)	8,4 \pm 1,8 (8,0 – 10,0)	0,02 \pm 0,005 (0,01 - 0,03)
Junho 2017	Neomachos	2	325,0 \pm 99,0 (255 – 395)	2,0 \pm 1,7** (0,8 - 3,2)	0,006 \pm 0,01 (0,002 - 0,01)
	Machos	8	418,1 \pm 77,4 (295 – 530)	7,7 \pm 1,8 (6,4 -11,8)	0,02 \pm 0,004 (0,01 - 0,03)

¹Um dos neomachos não apresentou liberação de sêmen.

*Diferença estatística pelo Teste de Mann-Whitney.

Tabela 2. Variáveis espermáticas analisadas no sêmen de neomachos (n=3) e de machos genotípicos (n=3) de *Rhamdia quelen* (média \pm desvio padrão) em setembro/2016. VCL = Velocidade curvilinear; VAP = Velocidade da trajetória média; VSL = Velocidade linear progressiva. LIN = Linearidade.

Variável espermática	Neomachos	Machos
Concentração (spz/mL)	$1,1 \times 10^{11} \pm 1,9 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^{11} \pm 3,9 \times 10^{10}$
Espermatócrito (%)	$18,8 \pm 18,7$	$25,5 \pm 7,2$
Normalidade morfológica (%)	$69,0 \pm 10,0^*$	$86,3 \pm 3,5$
Motilidade (%)	$75,0 \pm 0,2^1$	$75,0 \pm 0,1$
VCL ($\mu\text{m/s}$)	$82,7 \pm 4,4^1$	$80,8 \pm 7,9$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	$68,9 \pm 4,9^1$	$67,9 \pm 7,6$
VSL ($\mu\text{m/s}$)	$61,7 \pm 5,8^1$	$61,9 \pm 6,8$
LIN (%)	$90,0 \pm 0,03^1$	$91,0 \pm 0,03$
Integridade de membrana (%)	$70,8 \pm 33,6$	$81,3 \pm 8,1$
Taxa de fertilização (%)	$47,6 \pm 20,5^*$	$75,2 \pm 4,6$

¹Um dos neomachos não apresentou motilidade, velocidades e LIN pelo CASA.

* Diferença estatística pelo Teste de Mann-Whitney.

Em setembro/2016, a concentração espermática e o espermatócrito do sêmen de neomachos não diferiu ($p > 0,05$) de machos genotípicos (Tabela 2). Embora neomachos tenham apresentado um sêmen menos concentrado (Figura 1) e com menor quantidade de células precipitadas (Figura 2).

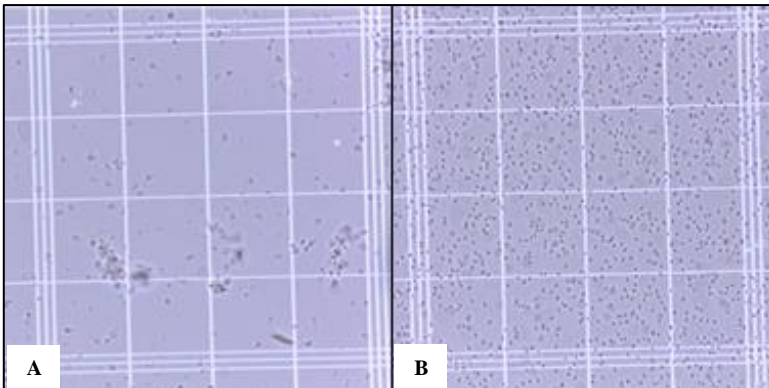


Figura 1. Concentração espermática analisada pelo método da câmara de Neubauer em setembro/2016. **A** – Neomachos. **B** – Macho genotípico.

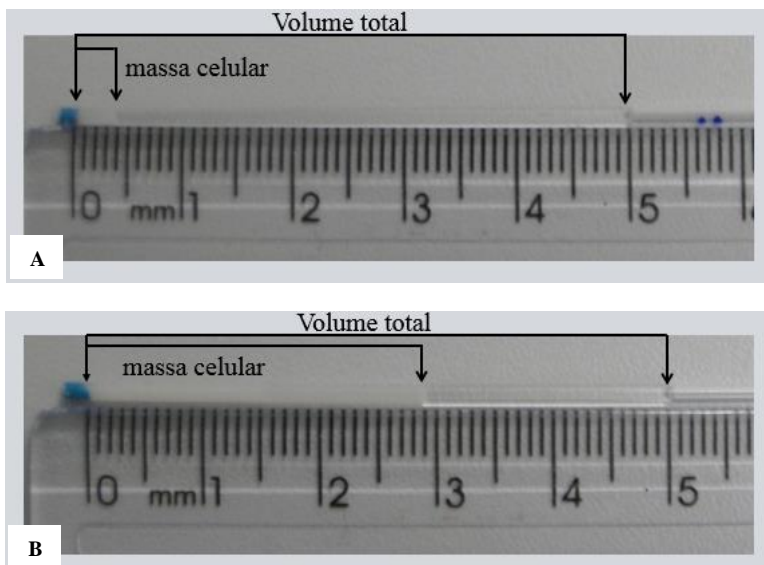


Figura 2. Massa celular precipitada em relação ao volume total pelo método do espermátocrito em setembro/2016. **A** – Neomacho. **B** – Macho genotípico.

Não foi observada relação ($p > 0,05$) entre a concentração espermática e o espermátocrito de neomachos e de machos genotípicos, sendo que não foi possível estimar a concentração espermática pelo método do espermátocrito.

Os neomachos de *R. quelen*, apresentaram espermatozoides com menor porcentagem de células com morfologia normal e com menor efetividade na fecundação dos ovócitos ($p < 0,05$), em comparação aos valores obtidos para machos genotípicos (Tabela 2).

Ao se relacionar a normalidade morfológica (%) com a taxa de fertilização (%) também não foi encontrada relação ($p > 0,05$) para neomachos e para machos genotípicos, embora tenha-se verificado que com alta normalidade obteve-se maior fertilização.

Neomachos e machos genotípicos apresentaram a mesma motilidade, sendo que as diferentes velocidades espermáticas e a linearidade foram semelhantes entre os dois grupos de peixes analisados. A integridade da membrana também não apresentou diferenças entre os dois grupos avaliados (Tabela 2).

Para as variáveis analisadas em abril/2017, os valores estão apresentados na Tabela 3, porém análises estatísticas não foram aplicadas devido ao baixo número de reprodutores neomachos.

O volume de sêmen produzido pelo único neomacho que liberou sêmen em abril/2017 foi semelhante ao obtido para machos genotípicos (Tabela 1).

O espermátocrito, a motilidade, as velocidades e a linearidade analisadas pelo CASA, a integridade da membrana e a taxa de fertilização apresentados por este neomacho, também apresentaram valores próximos aos observados para machos genotípicos (Tabela 3).

Na coleta realizada em junho/2017 o volume de sêmen de neomachos *R. quelen* foi menor em comparação ao dos machos genotípicos ($p < 0,05$) (Tabela 1). A produção de volume de sêmen em relação ao peso dos animais também se mostrou maior em machos.

Os neomachos apresentaram espermatozoides com menor concentração, espermátocrito e porcentagem de células normais em comparação aos valores obtidos para machos genotípicos ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 3. Variáveis espermáticas analisadas no sêmen de neomachos (n=2) e de machos genotípicos (n=8) de *Rhamdia quelen* (média \pm desvio padrão) em abril/2017. VCL = Velocidade curvilinear; VAP = Velocidade da trajetória média; VSL = Velocidade linear progressiva. LIN = Linearidade.

Variável espermática	Neomachos	Machos
Espermátocrito (%)	27,9	24,2 \pm 5,7
Motilidade (%)	13,0	23,0 \pm 0,1
VCL ($\mu\text{m/s}$)	74,1	74,1 \pm 14,8
VAP ($\mu\text{m/s}$)	57,8	61,2 \pm 16,0
VSL ($\mu\text{m/s}$)	57,1	58,3 \pm 14,5
LIN (%)	97,0	96,0 \pm 0,03
Integridade de membrana (%)	78,5	76,3 \pm 22,8
Taxa de fertilização	78,6	68,6 \pm 16,1

Um dos neomachos não apresentou liberação de sêmen.

Tabela 4. Variáveis espermáticas analisadas no sêmen de neomachos (n=2) e de machos genotípicos (n=8) de *Rhamdia quelen* (média \pm desvio padrão) em junho/2017.

Variável espermática	Neomachos	Machos
Concentração (spz/mL)	7,2x10 ⁸ \pm 1,0x10 ⁹ *	6,7x10 ¹⁰ \pm 5,1x10 ¹⁰
Espermátocrito (%)	0,9 \pm 1,4*	18,8 \pm 4,8
Normalidade morfológica (%)	28,5 \pm 27,5*	64,0 \pm 10,7
Integridade de membrana (%)	89,5 \pm 4,9	94,2 \pm 2,9

* Diferença estatística pelo Teste de Mann-Whitney.

A avaliação da integridade de membrana demonstrou que neomachos e machos genotípicos apresentaram alto percentual de espermatozoides íntegros (Tabela 4).

Em relação às anormalidades primárias e secundárias, verificou-se que os neomachos apresentaram maior porcentagem de anormalidades primárias, principalmente em junho, quando 61,7% das células espermáticas apresentaram algum defeito primário (Tabela 5).

Por comparação visual, observou-se que o sêmen dos animais, em todas as coletas apresentaram características de cor bem distintas.

Machos genotípicos invariavelmente apresentaram sêmen branco leitoso, indicativo de maior concentração, enquanto que o sêmen dos neomachos variou de aspecto aquoso para líquido, sem nenhum indicativo aparente de presença de células espermáticas, principalmente em junho/2017 (Figura 3).

No entanto, um dos neomachos, na primeira coleta realizada, apresentou sêmen com aspecto muito leitoso, bem próximo ao observado para machos.

Tabela 5. Anormalidades primárias (%) e secundárias (%) no sêmen de neomachos e machos genotípicos, analisadas em setembro/2016 e junho/2017.

Anormalidade	Set/2016		Jun/2017	
	Neomachos	Machos	Neomachos	Machos
Primária	19,7 ± 1,3	9,5 ± 1,0	61,7 ± 21,4	33,3 ± 11,7
Secundária	11,3 ± 11,1	4,2 ± 3,2	9,8 ± 2,7	2,7 ± 2,1

Primária: cauda dobrada, enrolada, curvada, pequena, grande, dupla.
Secundária: cauda-gancho, sem cabeça, sem cauda.

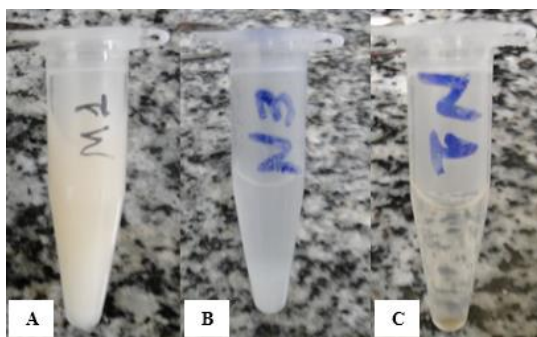


Figura 3. Comparação visual do sêmen de *Rhamdia quelen* em junho/2017. **A** – Macho genotípico; **B** e **C** – Neomachos.

DISCUSSÃO

De acordo com Luz et al. (2001) e Viveiros e Godinho (2009), o volume de sêmen é muito variável em peixes teleósteos, e pode ser alterado de acordo com o peso do indivíduo, da época e da metodologia de coleta.

O volume de sêmen relativo ao peso dos animais produzido por neomachos e machos genotípicos nas três coletas realizadas, foi inferior ao registrado por Bombardelli et al. (2006) para *R. quelen* ($0,036 \pm 0,008 \text{ mL.g}^{-1}$) em tanque escavado.

O menor peso dos animais registrado entre as análises e o reduzido intervalo de tempo entre as coletas de sêmen realizadas em abril e junho/17, podem ter causado uma redução no volume de sêmen de neomachos e machos genotípicos, acentuando a diferença no volume de sêmen produzido por neomachos em junho.

Embora neomachos de jundiá não apresentem problemas na função secretora do sêmen, como ocorreu com neomachos de *Perca fluviatilis* L. (RODINA et al., 2008) e com *Oncorhynchus mykiss* (KOWALSKI et al., 2011), em abril um dos neomachos não liberou sêmen.

A concentração espermática de machos genotípicos nas coletas de setembro e junho mostrou valores superiores a $1,79 \pm 0,46 \times 10^{10}$ spz/mL observado por Sanches et al. (2011a) também para o jundiá. Para os neomachos, o valor da concentração foi maior ao observado por esse autor em machos da espécie somente em setembro.

Em neomachos de *P. fluviatilis* L., a concentração do sêmen determinada por Rodina et al. (2008), foi um pouco superior ($45,3 \times 10^9$ spz/mL) do sêmen de macho genotípico da espécie ($37,8 \times 10^9$ spz/mL), indicando que o sêmen de neomachos pode apresentar concentração espermática igual ou superior a de machos.

Em junho, quando novamente foram quantificados o espermatócrito e a concentração do sêmen, foram registradas diferenças entre o sêmen de neomachos e machos genotípicos. O curto intervalo de tempo entre as coletas pode ter influenciado a redução da qualidade do sêmen de neomachos.

O sêmen dos neomachos, visualmente menos concentrado em junho/17 e com aspecto líquido, apresentou concentração inferior ao valor encontrado por Sanches et al. (2010a) de $9,2 \pm 0,9 \times 10^9$ spz/mL para machos da mesma espécie.

Fitzpatrick et al., (2005) observaram em *Oncorhynchus kisutch*, menor proporção de espermatozoides móveis em sêmen

coletado dos testículos de neomachos, cujo ductos espermáticos apresentavam desenvolvimento incompleto. A presença de ductos espermáticos em neomachos de jundiá (WEISS, 2016) permitiu obter valor acima de 70% para a motilidade em setembro.

A menor motilidade observada no mês de abril em relação a setembro, para ambos os grupos avaliados pode estar relacionada à redução do peso (g) dos animais entre a primeira e a segunda análise, que poderia indicar a ocorrência de algum tipo de estresse. Solis-Murgas et al. (2011) relataram que a motilidade pode ser influenciada por diversos fatores como estado nutricional, sanidade e condições de avaliação do sêmen.

Além desses fatores, o jundiá apresenta picos reprodutivos ao longo do ano (GOMES et al., 2000) e consequentemente mudanças observadas nos parâmetros dos espermatozoides entre as coletas, como redução no volume, concentração e motilidade sugerem que há associação entre essas mudanças e os processos de envelhecimento dos espermatozoides ocasionadas com o final do período reprodutivo.

O uso de sistemas computadorizados para avaliação espermática tem mostrado que as velocidades, assim como a motilidade, também apresentam correlação positiva com a fertilidade dos peixes (VIVEIROS et al., 2010; DZIEWULSKA et al. 2011), sendo que espermatozoides mais rápidos tendem a apresentar maior fertilização (GALLEGO et al., 2013).

Velocidades próximas às observadas para neomachos e machos genotípicos principalmente em setembro, foram descritos para o jundiá por Sanches et al. (2010a) no intervalo de tempo de 10-11 s após a ativação $84,0 \pm 1,7$; $77,3 \pm 1,7$ e $70,3 \pm 1,5$ $\mu\text{m/s}$ para VCL, VAP e VSL, respectivamente. Porém, foram maiores que as velocidades também observadas para o jundiá por Sanches et al. (2010b) aos 15 s ($77,5 \pm 15,0$; $58,7 \pm 9,0$ e $46,5 \pm 6,6$ $\mu\text{m/s}$), e aos 35 s ($66,4 \pm 16,1$; $42,4 \pm 10,5$ e $34,3 \pm 7,9$), após a ativação, para a VCL, VAP e VSL, respectivamente.

Neste estudo, foi considerado que os espermatozoides de neomachos apresentaram-se como rápidos, mesmo não apresentando altas taxas de fertilização, fato que pode estar relacionado com a perda da viabilidade dos espermatozoides de jundiá de acordo com o tempo após a ativação (SANCHES et al., 2010b).

Em abril, as velocidades para neomachos e machos genotípicos foram aproximadamente 10% inferiores as observadas em setembro, indicando que o final do período de reprodução do jundiá pode ter influenciado nas análises. Alavi et al. (2008) também observaram

redução da velocidade, do volume e da morfometria em *Barbus barbuis* no final do período reprodutivo, demonstrando a importância de coletar e realizar a análise do sêmen durante o pico reprodutivo da espécie.

Apesar da redução nos valores apresentados de velocidade, a VCL velocidade que expressa a trajetória real do espermatozoide permaneceu acima de 70%. Alavi et al. (2009) relataram haver divergências quanto ao melhor momento para a coleta e análise do sêmen, e que as características de qualidade espermática podem comportar-se de forma crescente ou decrescente durante a estação reprodutiva.

A elevada linearidade encontrada para neomachos tanto em setembro quanto em abril mostra que o deslocamento dos espermatozoides foi basicamente linear. Segundo Cosson (2010) os parâmetros de motilidade espermática e de linearidade são bons indicativos de qualidade, e representam uma extensa descrição das características de movimentação dos espermatozoides.

Sanches et al. (2015), encontrou para *S. parahybae* relação negativa entre a linearidade e a motilidade, presumindo que movimentos aleatórios ou circulares resultam em alta motilidade, mas quando predominam espermatozoides com movimento reto a motilidade é baixa, podendo influenciar negativamente na fertilização.

A elevada integridade da membrana dos espermatozoides de neomachos e de machos genotípicos foi similar ao valor observado por Bombardelli et al. (2006) para *R. quelen*.

De acordo com Sanches et al. (2011b) a determinação da integridade apresenta importantes implicações para o número total de espermatozoides viáveis produzidos por um reprodutor, o que possibilita a seleção e manutenção de estoque de animais com maior potencial reprodutivo. No entanto, apenas esta avaliação para a identificação de um futuro reprodutor não é segura, pois os espermatozoides mesmo apresentando membrana íntegra, podem apresentar defeitos morfológicos que comprometem a fertilização.

Segundo Melo-Maciél et al. (2012) a morfologia espermática está diretamente relacionada ao potencial fertilizante dos espermatozoides, e pode auxiliar na definição da qualidade seminal. No presente trabalho, os neomachos apresentaram menor porcentagem de espermatozoides normais do que os machos genotípicos, sendo a única variável que apresentou diferença significativa, nos dois períodos em que foi analisada. Em junho/2017, a normalidade dos espermatozoides apresentou redução em ambos os grupos, tendo sido mais evidente nos neomachos.

O aumento da porcentagem de espermatozoides com defeitos primários em neomachos de *R. quelen* observado em junho, refletiu a redução da qualidade do sêmen devido o final do período reprodutivo do jundiá, à frequência de coletas e ao esgotamento dos animais. Solis-Murgas et al. (2011) ressaltaram a importância da avaliação da morfologia de espermatozoides, para explicar o insucesso de reprodutores considerados aptos à reprodução, após análises convencionais de motilidade.

A baixa taxa de fertilização, registrada para neomachos de jundiá ($47,6 \pm 20,5\%$) em setembro foi próxima à encontrada por Rodina et al. (2008) para neomachos de *P. fluviatilis* L. (42,5%), mas ao contrário do registrado por esses autores, no presente estudo houve diferença em relação a taxa de fertilização de neomachos e de machos genotípicos.

Para neomachos, a menor porcentagem de espermatozoides normais avaliados em setembro, bem como elevada linearidade e reduzida concentração resultou em menor taxa de fertilização mesmo apresentando motilidade similar a de machos normais.

Ao avaliar novamente a taxa de fertilização em abril, foi registrado um aumento de 30% na fecundação dos neomachos. Todavia, a taxa de fertilização dos neomachos nesse mês foi analisada em função de ovócitos fecundados por um único animal, que apresentou características seminais mais similares a de machos genotípicos, indicando que há neomachos com igual potencial de fertilização, também a VCL, espermátócrito e a integridade de membrana de neomachos se mantiveram altos em abril, garantindo maior taxa de fertilização, apesar da redução na taxa de motilidade e do alto valor de linearidade.

Em relação aos machos genotípicos avaliados em abril, com o aumento do número de animais a taxa de fertilização foi um pouco menor do que à registrada em setembro, indicando que os animais podem apresentar diferenças intra específicas em relação a qualidade do sêmen, o que tem interferência na eficiência da fecundação. Dessa forma é necessário que cada reprodutor tenha seus gametas analisados individualmente para determinar seu potencial ótimo de fertilização (SUQUET et al., 1995).

Para neomachos, o aparente efeito individual do sêmen, indica que a característica seminal é mais importante que o fato dos animais serem neomachos ou machos genotípicos e que a variação nos parâmetros avaliados entre os neomachos como evidenciado pelos altos

valores do desvio padrão em setembro e junho, mostra a necessidade de realizar a análise individual também do sêmen desses animais.

A comparação visual permitiu identificar que o sêmen dos neomachos se mostrou com características de cor e aspecto distintos aos machos genotípicos, mas a variação no aspecto apresentado entre os neomachos, com sêmen variando de aquoso a líquido e um dos animais apresentando aspecto branco leitoso, igual aos machos genotípicos ressalta a diferença entre o sêmen dos neomachos. O único neomacho que apresentou aspecto similar ao sêmen dos machos, apenas em setembro, também mostra a redução da qualidade do sêmen durante as coletas realizadas.

Os resultados sugerem que os neomachos apresentaram sêmen similar ao de machos genotípicos. Entretanto, diferenças encontradas para a taxa de fertilização e normalidade morfológica em setembro, bem como volume, concentração, espermatócrito e normalidade morfológica em junho indicam que o tratamento hormonal usado para a inversão do sexo afetou a qualidade dos espermatozoides, sendo a redução da qualidade do sêmen em neomachos em relação aos machos genotípicos mais acentuada com o final do período reprodutivo e a frequência das coletas.

CONCLUSÕES

Neomachos de *R. quelen* apresentam liberação do sêmen, e seu sêmen é capaz de realizar a fecundação de ovócitos e gerar descendentes.

Diferenças individuais entre os neomachos indicam que alguns peixes revertidos apresentam potencial de fertilização similar ao de machos genotípicos, o que possibilitaria um maior potencial de fêmeas entre os descendentes.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S.M.H.; PSENICKA, M.; RODINA, M.; POLICAR, T. 2008. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquatic Living Resources*, 21(1): 75-80.
- ALAVI, S.M.H.; PSENICKA, M.; POLICAR, T.; RODINA, M.; HAMÁCKOVÁ, J.; KOZÁK, P.; LINHART, O. 2009. Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4): 683-693.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25(3): 317-325.
- AMARAL-JUNIOR, H.; NUNES, M.F.S.; GARCIA, S. 2008. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. *Revista Eletrônica de Veterinária*, 9(12).
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. 2011. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 35(2): 145-151.
- BALDISSEROTO, B. 2004. *Biologia do jundiá*. In: BALDISSEROTO, B.; RADÜNZ NETO, J. (Eds.) *Criação de jundiá*. Santa Maria: Editora UFSM, 232p.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 535-548.
- BLOM, E. 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility*, 1(2): 176-177.
- BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPPERRECK, M.A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4): 1251-1257.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI-FILHO, E.; HARVEY, B.J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63(2): 472-489. 2003.

CBRA. 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 49p.

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

DZIEWULSKA, K.; RZEMIENIECKI, A.; CZERNIAWSKI, R.; DOMAGALA, J. 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, 76(2): 300-311.

FITZPATRICKA, J.L. HENRY, J.C.; LILEY, N.R.; DEVLIN, R.H. 2005. Sperm characteristics and fertilization success of masculinized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 249(1/4): 459-468.

GALLEGO, V.; PÉREZ IGUALADA, L.M.; ASTURIANO NEMESIO, J.F.; YOSHIDA, M. 2013. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture*, 416: 238-243.

KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições campo. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13(1): 95-100.

KIME, D.E.; VAN LOOK, K.J.; MCALLISTER, B.G.; HUVSKENS, G. RURANGWA, E.; OLLEVIER, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4): 425-433.

KOWALSKI, R.K.; SAROSIEK, B.; DEMIANOWICZ, W.; JUDEK, J.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H.; DEMSKA-ZAKÉS, K.; BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J. 2011. Quatitative

characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Neo-Males (XX Genotype) and Super-Males (YY Genotype) Sperm. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 5(5).

LOPES, J.T.; PINHEIRO, J.P.S.; NUNES, L.T.; PINHEIRO, R.R.R.; SOUZA, M.E.M.; ALMEIDA, P.S.; NASCIMENTO, R.V.; CAMPELLO, C.C.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. 2014. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38(3): 170-175.

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE, D.A.T; ZANIBONI FILHO, E. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(1): 39-42.

MATOS, D.L.; MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. 2008. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(4): 225-232.

MELO-MACIEL, M.A.P.; SALMITOVANDERLEY, C.S.B.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, C.E.; OLIVEIRA, M.S.; LOPES, J.T.; NUNES, J.F. 2012. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. *Ciência Animal*, 22(1): 269-283.

MONTANHA, F.P.; NAGASHIMA, J.C.; KIRNEW, M.D.; ASTRUSKAS, J.P.; PIMPÃO, C.T. 2011. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia quelen*. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 9(17): 1-8.

REIS, V.R.; ALMEIDA, F.L.; PIFERRE, F. 2016. Produção de populações monossexo em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 40(1): 22-28.

RODINA, M.; POLICAR, T.; LINHART, O. 2008. Cryopreservation of sperm of testicular neomales and stripped normal males of European perch (*Perca fluviatilis* L.). *Cybium*, 32(2): 214.

ROUTRAY, P.; VERMA, D.K.; SARKAR, S.K.; SARANGI, N. 2007. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation, *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(4): 413-427.

RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F.A.M; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 55(3): 751-769.

SANCHES, E.A.; TESSARO, L.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C.P.R.; BOMBARDELLI, R.A.; ROMAGOSA, E. 2010a. Parâmetros de motilidade espermática de *Rhamdia quelen* avaliados entre 10 e 14 segundos após ativação. In: II Simpósio Nacional de Engenharia de Pesca (II SINPESCA), IV Simpósio Paranaense de Engenharia de Pesca (IV SINPESCA), XII Semana Acadêmica de Engenharia de Pesca, 2010, Toledo/PR. *Anais do II SINPESCA*.

SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R.A.; MARCOS, R.M.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C.P.R.; ROMAGOSA, E. 2010b. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research*, 42(1): 153-156.

SANCHES, E.A.; MARCOS, R.M.; BAGGIO, D.M.; BALEN, L.T.R.E.; BOMBARDELLI, R.A. 2011a. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(6): 1163-1167.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A; BAGGIO, D.M.; SYKORA, R.M.; XAVIER, A.M.M. 2011b. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 35(3): 357-362.

SANCHES, E.A.; OKAXARA, R.Y.; CANEPPELE, D.; TOLEDO, C.P.R.; BOMBARDELLI, R.A.; ROMAGOSA, E. 2015. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112h of storage at four temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*, 31: 79-88.

SANCHES, E.G. e CERQUEIRA, V.R. 2010. Refrigeração do sêmen do Ariocó *Lutjanus synagris*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(4): 293-305.

SHIRO JR., O.K. 2013. *Características seminais de cachara Pseudoplatystoma reticulatum, na piracema*. Campo Grande, MG, 68 f. (Dissertação Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul).

SOARES, F.A.C.; STREIT JR, D.P.; EBERT, A.R.; COLDEBELLA, I.J.; OBERST, E.R. 2010. Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, 17(3/4): 129-133.

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

STREIT JR. D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R. P.; POYH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, A.L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, 7(2): 157-162.

STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; VARGAS, L.D.M; WATANABE, A.L. 2008. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus Valenciennes, 1850*). *Brazilian Journal of Biology*, 68(2): 373-377.

SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. 1995. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture*, 133: 83-90.

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

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H. ISAÚ, Z.A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked

prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74(4): 551-556.

WEISS, L.A. 2016. *Inversão sexual em jundiá Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1924): masculinização com 17 α -metiltestosterona e feminização indireta*. Florianópolis, SC, 117 f. Tese Doutorado em Aquicultura – UFSC.

WIRTZ, S.; STEINMANN, P. 2006. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology*, 68: 1896-1902.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. 1980. The artificial propagation of warm-water finfishes a manual for extension. *FAO Fisheries Technical Paper*, (201).

ZANIBONI FILHO, E. 1992. *Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1818)*, São Carlos, SP, 202 p. (Tese Doutorado em Ciências. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar).

ZANIBONI FILHO, E; BALDISSEROTTO, B. 2015. Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 39(1): 189-194.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo descreveu, pela primeira vez, características do sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen* e da sequência as pesquisas iniciadas com os neomachos obtidos por Weiss (2016).

O trabalho destaca que a dificuldade na obtenção de neomachos, não permitiu avaliar um número maior de animais e que apesar dos resultados terem sido promissores, novos estudos são necessários para avaliar a qualidade do sêmen de fêmeas revertidas de jundiá.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABRUNHOSA, F. **Técnico em aquicultura**. 2011. 116 f. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - IFPA, Pará. 2011.

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

AMARAL-JUNIOR, H. et al. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. *Revista Eletrônica de Veterinária*, v. 9, n. 12, 2008a.

AMARAL-JUNIOR, H. et al. **Otimização da produção de monosexo de Jundiá *Rhamdia quelen*, através do uso de estrógenos para a feminilização no sul do Brasil**. EPAGRI/CEDAP/CEPC. Camboriú, 2008b.

AMARAL-JUNIOR, H. **Influência da rede jundiá na piscicultura do estado de Santa Catarina** - Workshop sobre jundiá. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 2013.

AMORIN, F. S. **Determinação de 17 α -Metiltestosterona em amostras de sedimentos de tanques de piscicultura de peixes tilápia do Nilo**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, na Área de concentração de Química Analítica, Brasília, 2013.

ARAÚJO, R. V. **Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de Surubim-do-Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores**. 2011. 91 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

ATTAYDE, J. L. et al. Impactos da introdução da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre a estrutura trófica dos ecossistemas

aquáticos do Bioma Caatinga. **Oecologia Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 450-461, 2007.

BALDISSEROTO, B. **Biologia do jundiá**. In: BALDISSEROTO, B.; RADÜNZ NETO, J. (Eds.) **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Jundiá (*Rhamdia* sp.)**. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, C. L. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 303-319. 2005.

BARBIERI, E. et al. Ocorrência de espécies exóticas na comunidade do Jaíre no Rio Ribeira de Iguape. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 68/69, p. 269-276, 2007.

BARCELLOS, L. J. et al. **Workshop sobre jundiá – História e perspectivas**. Editora Universidade de Passo Fundo, 2013. 266p.

BATISTA, E. B. et al. **Reversão sexual de betas para pequenos produtores**. 2013. 5 f. Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar – VI MICTI, Instituto Federal Catarinense, 2013.

BEZERRA, K. S. **Efeito do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, Linhagem Chitralada, durante e após a reversão sexual**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2007.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Aplicação de métodos diretos e indiretos para a produção de populações monossexuais na tilapicultura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**. UNIPAR, v. 7, n. 1, p. 57-68, 2004.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Idade de maior sensibilidade de tilápias-do-Nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2007.

BORGES, A. **Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses sub-letais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do jundiá *Rhamdia quelen***. 2005. 175 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

BORGES, B. A. A. **Identificação de neomacho de Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) através do teste de progênie**. 2015. 21 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v. 57, p. 299-309, 1986.

CABRITA, E. et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 623-635, 2010.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CAVALCANTE, S. S. **Caracterização das subpopulações espermáticas do tambaqui e sua correlação com a fertilidade**. 2014. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

CAVALCANTE, T. V. et al. Análise computadorizada (CASA) e convencional da motilidade espermática de sêmen caprino das raças Boer e Apina e Primavera, **ARS Veterinaria**, v. 21, p. 203-208, 2005.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2a. Ed. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1998. 49 f.

CESAR, M. P. et al. **Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura. Boletim Agropecuário.** 2005. 27 f. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

CNAANI, A. LEVAVI-SIVAN, B. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. **Sexual Development in Aquaculture**, n.3. p.164-175, 2009.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R. et al. Reversão sexual de larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 4, p. 391-395, 2007.

DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 381-392, 1996.

DRUMMOND, C. D. **Níveis de 17 α -Metiltestosterona em diferentes temperaturas na inversão sexual de tilápias *Oreochromis niloticus*.** 2007. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras. 2007.

DUNHAM, R. A. et al. **Review of the status of aquaculture genetic. In: Aquaculture in the Third Millennium (NACA and FAO, Bangkok 2001).** Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, p. 137-166. 2001.

EMBRAPA - Plantel só de fêmeas aumenta produtividade do tambaqui. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015.

EPAGRI/CEDAP. Síntese da produção da piscicultura catarinense em 2012. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina**, Florianópolis, 2012. 12 f.

EPAGRI/CEDAP. Síntese da produção da piscicultura catarinense em 2012. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina** / Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca, 2013.

EPAGRI/CEDAP. Desempenho da piscicultura de água doce:2014. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina** / Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca, 2015.

EPAGRI. Cultivo de jundiás em monocultivo e em bicultivo com tilápias. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina**, Florianópolis, 2017.

FAUVEL, C. et al. Evaluation of fish sperm quality. **Journal Applied Ichthyology**, v. 26, p. 636-643, 2010.

FELIZARDO, V. O. **Manejo reprodutivo da Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FRACALOSSO, D. M. et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n.3, p. 345-352, 2004.

GASPARINI, C. et al. Effect of male age on sperm traits and sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Evolutionary Biology**, Padova, v. 23, p. 124-135, 2010.

GHIRALDELLI, L. et al. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p.349-356, 2007.

GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae), **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GRAEFF, A. et al. Produção de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Boletim Técnico**, 2008. 26 f.

GROZEA, A. et al. Attempts of induction of sex-reversal in carp (*Cyprinus carpio* Var. Koi) using testosterone. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 40, p. 17-22, 2007.

ISLER, I. V. Biotechnology applied to salmoniculture. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 36-42, 2009.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.

KIRANKUMAR, S. e PANDIAN, T. J. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 606-616, 2002.

KOCOUR, M. et al. Results of comparative growing test of all-female and bisexual population in two-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture International**, v. 11, p. 369-378, 2003.

KOWALSKI, R. K. et al. Quantitative characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Neo-Males (XX Genotype) and Super-Males (YY Genotype) Sperm. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 5, n. 5, 2011.

LEE, P. et al. Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. **North American Journal of Aquaculture**, v. 66, p. 1-7, 2004.

LENZ, D. R. **Caracterização e criopreservação de sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

LIMA, F. P. C. Reversão sexual em tilápias (*Oreochromis niloticus*). **UNIFOR**, Minas Gerais, 6 f. 2011.

LINHARES, F. R. A. et al. Anormalidades em espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio*, frescos ou criopreservados em diluidor

a base de água de coco em pó CACP-104®). 2012. **Ciência Animal - Suplemento**, VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2012.

LOOK, V. K. J. W. et al. Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative. Biochemistry and Physiology**, v. 130, n. 4, p. 425-433. 2001.

LOPES, J. T. et al. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 3, p. 170-175, 2014.

MATAVELI, M. et al. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2007.

MATOS, D. L. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MELO, M. A. P. **Água de coco em pó (acp-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós descongelamento**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

MELO-MACIEL, M. A. P. et al. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 269-283, 2012.

MEURER, F. et al. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nylo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p.791-794, 2008.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei).** 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2004.

MONTANHA, F. P. et al. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia quelen*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 17, p. 1-8, 2011.

MORE: **Mecanismo online para referências.** Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013.

MOTA, C. S. **Desenvolvimento de tecnologia de cultivo para peixes nativos da Bacia do Rio Uruguai.** 2013. 57 f. Relatório de Estágio Obrigatório apresentado a Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2013.

NARAHARA, M. Y. et al. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 3, p. 123-137, 1985.

NASCIMENTO, A. L. **Peixes criopreservado em diferentes meios avaliada por método subjetivo e computadorizado.** 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

NASCIMENTO, A. F. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 324-329, 2010.

PANDIAN, T. J. **Sex reversal.** In: PANDIAN, T. J. (Ed.). *Endocrine Sex Differentiation in Fish*. Florida: CRC Press, p. 175-212, 2013.

PAMPLONA, J. H. **Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PERDICES, A. et al. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 172-189, 2002.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Elsevier Science. **Aquaculture**. n. 197, p. 229-281, 2001.

RAZMI, K. et al. Hormonal sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by ethnylestradiol-17 α (EE2). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, p.304-315, 2011.

REIS, V. R. **Feminização de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) com administração de 17 β -estradiol na dieta.** 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

REIS, V. R. et al. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 1, p. 22-28, 2016.

ROBLES, V. et al. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. **Aquaculture**. v. 224, n.1/4, p. 203-212, 2003.

RODINA, M. et al. Cryopreservation of sperm of testicular neomales and stripped normal males of European perch (*Perca fluviatilis* L.). **Cybiurn**, v. 32, n. 2, p. 214, 2008.

ROTHBARD, S. A. A review of ploidy manipulations in aquaculture: the Israeli experience. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgheh**, v. 58, p. 266-279, 2006.

ROUTRAY, P. et al. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation, **Fish Physiol Biochem**, v. 33, p. 413-427, 2007.

RURANGWA, E. et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 751-769, 2001.

RURANGWA, E. et al. 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. et al. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes characiformes. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 8, Supl. 2, p. 343-350, 2014.

SANCHES, E. A. et al. **Desempenho reprodutivo de machos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) (Quoy e Gaimard, 1824) submetidos a dietas contendo diferentes níveis de energia digestível**. In: Simpósio Nacional de Engenharia de Pesca, 1.; Simpósio Paranaense de Engenharia de Pesca, 3.; Semana Acadêmica de Engenharia de Pesca, Unioeste, Toledo. Anais, 2006.

SANCHES, E. A. et al. Dose inseminante para fertilização de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2091-2098, 2009a.

SANCHES, E. A. **Efeito da estocagem a curto prazo e da temperatura sobre gametas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009b.

SANCHES, E. A. et al. Parâmetros de motilidade espermática de *Rhamdia quelen* avaliados entre 10 e 14 segundos após ativação. In: II Simpósio Nacional de Engenharia de Pesca (II SINPESCA), IV Simpósio Paranaense de Engenharia de Pesca (IV SINPESCA), XII Semana Acadêmica de Engenharia de Pesca, 2010, Toledo/PR. **Anais do II SINPESCA**, 2010a.

SANCHES, E. A. et al. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 1, p. 153-156, 2010b.

SANCHES, E. A. et al. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1163-1167, 2011a.

SANCHES, E. A. et al. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 357-362, 2011b.

SANTOS, A. J. G.; SILVA, A. L. N. Biotecnologia em Aquicultura: Processos, riscos e cuidados. Ênfase à produção de tilápias. **Panorama da Aquicultura**, v. 45, p. 22-26, 1998.

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae)**. 2004. 124 f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2004.

SHIMODA, E. et al. **Utilização do espermátócrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*)**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 44, p. 19-24, 2007.

SHIRO JR., O. K. **Características seminais de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*, na piracema**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

SILVA, S. V. et al. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciências Veterinárias dos Trópicos**, v. 12, n. 1/2/3, p. 1-15, 2009.

SOARES, F. A. C. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 17, n. 3/4, p. 129-133, 2010.

SOLIS-MURGAS, L. D. et al. Viabilidade espermática do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4 °C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

SOLIS-MURGAS, L. D. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.

STREIT JR. D. P. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

STREIT JR., D. P. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006.

STREIT JR., D. P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim Instituto da Pesca**, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.

TABATA, Y. A. Atualização sobre métodos e procedimentos para obtenção de populações monosexo de peixes: produção de fêmeas. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / SAA-SP**. Estação Experimental de Salmonicultura, 2000.

TARANGER, G. L. et al. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 483-515, 2010.

TEBALDI, P. C. e AMARAL JUNIOR, H. Produção de tetraplóides de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) através da aplicação de choque térmico. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 10, n. 10, p. 1-13, 2009.

TROCA, D. F. A. e VIEIRA, J. P. Potencial invasor dos peixes não nativos cultivados na região costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**, n. 38; v. 2; p. 109-120, 2012.

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética III**, Universidade de São Paulo. 1996. 27p.

TURRA, E. M. et al. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p.21-28, 2010.

TUSET, V. M. et al. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 69, p. 1033-1038, 2008.

VALENTIN, F. N. **Processo de diferenciação gonadal em *Pseudoplatystoma fasciatum* e tentativa de feminilização com 17 β -estradiol**. 2013. 38 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, 2013.

VELARDE, J. M. C. **Avaliação das características seminais e criopreservação do sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes Pimelodidae)**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2013.

VÉLEZ, V.; ELIZABETH M. **Crioconservación de sêmen para neomachos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* en el proyecto de mejoramiento genético**. 2010. 84 f. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí, 2010.

VERSTEGEN, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) e criopreservação e diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2010.

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

VIVEIROS, A. T. M. et al. 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.

WEISS, L. A. **Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1924): masculinização com 17 α -metilttestosterona e feminilização indireta**. 2016. 117 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura – UFSC, Florianópolis, 2016.

ZANARDI, M. F. et al. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p.7-11, 2011.

ZANIBONI FILHO, E. **Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818)**. 1992. 202 p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, 1992.

ZANIBONI FILHO, E; BALDISSEROTTO, B. Congelamento de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 189-194, 2015.

ZANONI, M. A. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes a temperaturas durante fase de diferenciação sexual, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 455-466, 2013.

APÊNDICES



Apêndice 1. Coleta seminal de neomachos de *Rhamdia quelen* em setembro/2016.



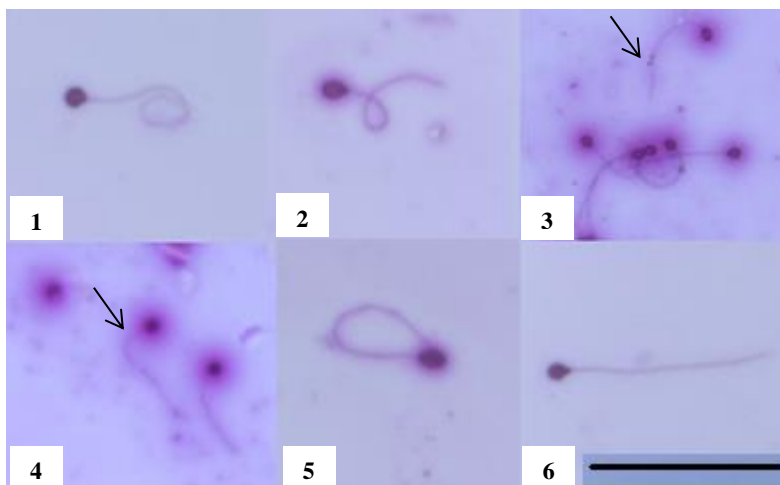
Apêndice 2. Coleta seminal de machos genotípicos de *Rhamdia quelen* em setembro/2016.



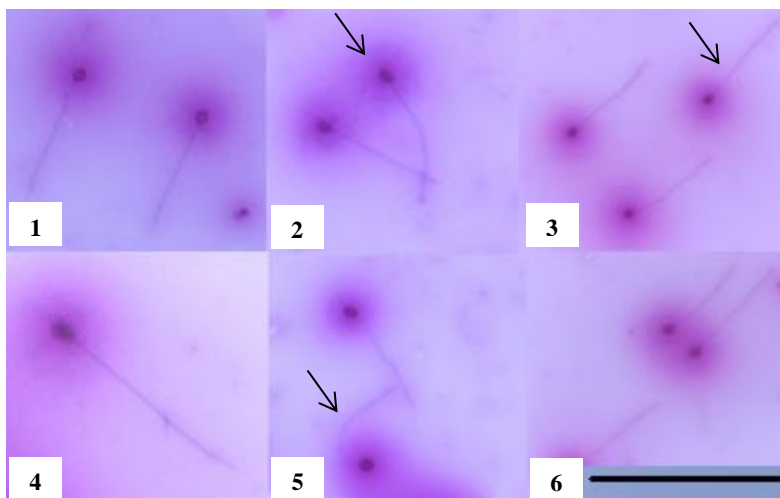
Apêndice 3. Sêmen coletado de neomachos de *R. quelen* em junho/2017.



Apêndice 4. Sêmen coletado de machos genotípicos *R. quelen* em junho/2017.



Apêndice 5. Morfologia espermática do sêmen de neomachos de *R. quelen*: **1, 2.** Cauda Enrolada; **3, 4.** Cauda Curvada; **5.** Cauda dobrada; **6.** Cauda normal em junho/2017. Barra: 0,2 mm (3); 0,05 mm (1, 2, 4, 5, 6).



Apêndice 6. Morfologia espermática do sêmen de machos genotípicos de *R. quelen*: **1, 3, 4, 6.** Cauda Normal; **2, 5.** Cauda Curvada em junho/2017. Barra: 0,2 mm (1, 2, 3, 5, 6); 0,05 mm (4).

ANEXO

Aprovação do Protocolo CEUA PP00788

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00788

Título

Desenvolvimento de Tecnologia de Cultivo de Peixes Nativos pelo LAPAD/UFSC.

Data de Entrada

14/08/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

04/10/2013

Considerações

Ofício nº 105/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Evoy Zaniboni Filho, Departamento de Aquicultura - CCA

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dez mil peixes: Jundiá (*Rhamdia quelen*); Dourado (*Salminus brasiliensis*); Surubi (*Steindachneridion scriptum*); Piava (*Leporinus obtusidens*), Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*); Curimba (*Prochilodus lineatus*) e Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

- Procedência do animal: Bacia do rio Uruguai e produção própria.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 07/01/2017**

Data 07/10/2013

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

[Abrir Solicitação](#)[Criar Relatório](#)[Parecer01_PP00788.pdf](#)[Parecer02_PP00788.pdf](#)