

Universidade Estadual Paulista - UNESP
Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP

**INDUÇÃO A ESPERMIAÇÃO DO MANDI-
PINTADO, *Pimelodus britskii* NO PERÍODO
REPRODUTIVO**

(Teleostei: Pimelodidae)

Danielle Zanerato Damasceno

Jaboticabal-SP

2014

Universidade Estadual Paulista - UNESP
Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP

INDUÇÃO A ESPERMIAÇÃO DO MANDI-PINTADO, *Pimelodus britskii*

NO PERÍODO REPRODUTIVO

(Teleostei: Pimelodidae)

Danielle Zanerato Damasceno

Orientadora: Dra. Elizabeth Romagosa

Co-orientador: Dr. Robie Allan Bombardelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal-SP

2014

Damasceno, Danielle Zanerato
D154i Indução a espermição do mandi-pintado, *Pimelodus britskii*, no período reprodutivo / Danielle Zanerato Damasceno. -- Jaboticabal, 2014
ix, 47 p : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2014

Orientadora: Elizabeth Elizabeth Romagosa
Banca examinadora: Sérgio Ricardo Batlouni, Alexandre Ninhaus
Silveira

Bibliografia

1. Características seminais. 2. Ciclo reprodutivo. 3. Extrato de hipófise de carpa. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INDUÇÃO A ESPERMIÇÃO DO MANDI-PINTADO,
Pimelodus britskii NO PERÍODO REPRODUTIVO"

AUTORA: DANIELLE ZANERATO DAMASCENO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBIE ALLAN BOMBARDELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

Centro de Pesquisa Em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca de São Paulo

Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

Laboratório de Reprodução de Peixes / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Prof. Dr. ALEXANDRE NINKHAUS SILVEIRA

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

1	Revisão de literatura	12
1.1	Espécie estudada: <i>Pimelodus britskii</i>	12
1.2	Morfologia testicular	13
1.3	Reprodução artificial	13
1.4	Qualidade dos gametas	15
1.5	Parâmetros gametas masculinos	15
2	Literatura consultada	16
3	ARTIGO:	22
	INDUÇÃO À ESPERMIAÇÃO DE <i>Pimelodus britskii</i> (Teleostei: Pimelodidae)	22
4	Introdução	27
5	Material e métodos	28
5.1	Espécie e Local de estudo	28
5.2	Condução do experimento	29
5.3	Coleta de sêmen	30
5.4	Análises do sêmen	31
6	Análise estatística	33
7	Resultados	33
7.1	Etapa 1	38
7.2	Etapa2	33
8	Discussão	42
9	Conclusão	48
10	Referências bibliográficas	51
11	Anexo 1 – Paracer do Comitê de Ética Animal da UNIOESTE	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de mandi-pintado, <i>Pimelodus britskii</i>	12
Figura 2. Detalhes de uma seringa adaptada para a maceração dos testículos.	30
Figura 3. Testículo do mandi-pintado, <i>P. britskii</i> , dividido em três regiões. RC: região caudal, RI: região intermediária e RCR: região cranial.....	34
Figura 4. Índice testículossomático (IGS, %) dos <i>P. britskii</i> , ao longo do ciclo reprodutivo.....	37
Figura 5. A) Concentração e B) motilidade espermática dos <i>P. britskii</i> , submetidos ao Etapa1 durante o experimento. [Tratamentos: T2) dose única 3 mg.kg ⁻¹ EHC; T3) dose prévia 0,5 mg.kg ⁻¹ EHC, 2ª dose 3 mg.kg ⁻¹ ; T4) dose prévia 0,5 mg.kg ⁻¹ 2ª dose 7mg.kg ⁻¹ ; T5) dose única 200 UI hCG.kg ⁻¹].....	40
Figura 6. A)Velocidade espermática e B) tempo total de ativação do sêmen de <i>P. britskii</i> , submetidos à Etapa1 durante o experimento. [Tratamentos: T2) dose única 3 mg.kg ⁻¹ EHC; T3) dose prévia 0,5 mg.kg ⁻¹ EHC, 2ª dose 3 mg.kg ⁻¹ ; T4) dose prévia 0,5 mg.kg ⁻¹ EHC 2ª dose 7mg.kg ⁻¹ ; T5) dose única 200 UI hCG.kg ⁻¹].	41
Figura 7. Machos de <i>P. britskii</i> . A) Seleção de machos no tanque; B) Pesagem em laboratório; C) Marcação e leitura dos TAG's; D) Indução hormonal; E) Anestesia com solução de benzocaína; F) Coleta de sêmen por meio de massagem abdominal.....	49
Figura 8. A) Testículos de <i>P. britskii</i> eutanasiado para retirada dos testículos; B) Pesagem dos testículos em balança analítica; C) Corte dos testículos; D) Maceração dos testículos e coleta de sêmen; E) Análises espermáticas no software livre CASA; F) Análise espermática em microscópio (concentração e morfologia espermática).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis seminais e espermáticas dos *P. britskii*, em relação aos tratamentos hormonais e período de novembro/2011 a março/2012.....36

Tabela 2. Variáveis seminais e espermáticas dos *P. britskii* submetidos aos cinco tratamentos hormonais no período de novembro/2012 a março/2013.....39

Dedicatória

Aos meus pais Antonio e Mereide, e à minha irmã Dayane, pelos quais tenho o maior amor do mundo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e às forças divinas que nos regem e pelas quais tenho a fé que me anima todos os dias a seguir e acreditar que há sempre algo bom em tudo.

Aos meus pais Antonio e Mereide, e à minha irmã Dayane por todo carinho, apoio, confiança e principalmente, amor que têm por mim. Vocês estão comigo a todo momento!!

A minha orientadora Dra. Elizabeth Romagosa, que com toda sua paciência, dedicação, atenção e humildade me ajudou a conduzir este trabalho, e também se tornou uma amiga que quero ter sempre por perto.

Ao meu co-orientador Dr. Robie Allan Bombardelli, pelo apoio e incentivo para que eu me inscrevesse no Caunesp, e pela atenção dedicada durante a realização do experimento.

Ao professor Dr. Pitágoras Augusto Piana, pelas dicas e auxílios.

Agradeço à banca examinadora, Prof. Dr. Sérgio R. Batlouni e Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira pelas dicas e novas perspectivas dadas ao trabalho.

Aos meus eternos amigos e companheiros Ricardo Andrei Krause e Fernanda Freitas Andrade, que estão sempre ao meu lado, apoiando, brigando, enxugando as lágrimas. Eu amo vocês!!

Aos companheiros de luta e trabalho, Alexandre H. Buzzzi, Cesar P.R de Toledo, Giovano Neumann, Maurício S. Adames, Ricardo A. Krause, Vitor Sendin. Muito obrigada por toda ajuda durante a execução do experimento!

Gostaria de agradecer também, ao Caunesp, ao Laboratório da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis, ao Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental e à UNIOESTE, pelo auxílio com estrutura, equipamentos, logística e material biológico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo pela bolsa de mestrado.

E por fim gostaria de agradecer a todos que participam da minha vida de uma forma ou de outra, trabalhando junto ou simplesmente sendo amigo: Arno Butzge, Adriano Heinen, Andressa Fierli, Cintia Burato, Cleonice Hilbig, Dihego, Eduardo Sanches, Evandro, Lucélia, Pablo Fungheto, Rogério Druzian, Tatiane Lui, Yuri Contrera.

Apoio Financeiro

Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado, processo n° 2012/17789-3.

1 Revisão de literatura

1.1 Espécie estudada: *Pimelodus britskii*

O gênero *Pimelodus* (La Cépède) é o gênero mais rico em espécies dentro da família Pimelodidae, contendo 26 espécies (Ribeiro & Lucena, 2006). Entre estas espécies encontra-se o *Pimelodus britskii*, vulgarmente conhecido como mandi-pintado, pertence a família Pimelodidae e ordem dos Siluriformes, endêmica do rio Iguaçu (Garavello e Shibatta, 2007). Até pouco tempo era classificada como *Pimelodus ortmanni*, uma espécie congênere, mas em 2007 foi descrita por Garavello e Shibatta. Seu corpo é acinzentado nas regiões dorsal e ventral, com manchas pretas arredondadas, é considerada uma espécie de grande porte e com alto índice de captura no baixo rio Iguaçu (Baumgartner et al., 2012), sendo muito apreciada nas comunidades locais. Esta espécie é amplamente capturada no baixo rio Iguaçu, Paraná, Brasil, e apresenta hábito alimentar oportunista (segundo o Relatório da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2009).

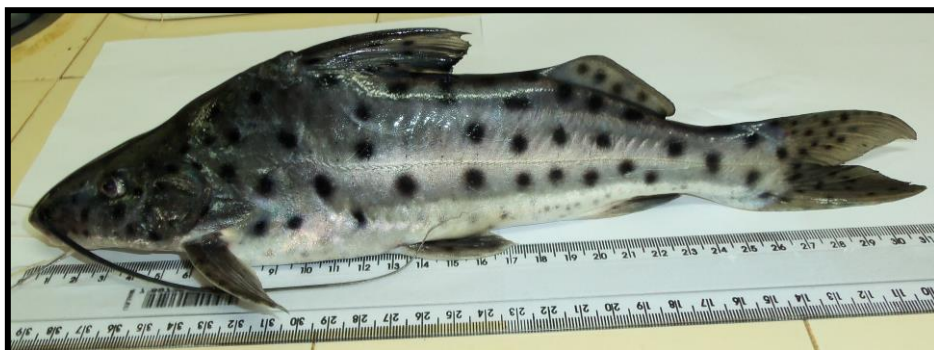


Figura 1. Exemplar de mandi-pintado, *Pimelodus britskii*.

Esta ordem é a quarta dentro dos vertebrados, é o grupo de peixes mais diversificado e extensamente distribuído a nível mundial, com mais de 2400 espécies (Pinna, 1998). As principais características das espécies dessa ordem são: a presença de um a quatro pares de barbilhões, nadadeira adiposa, e a ausência de escamas sobre o corpo, sendo revestido apenas por pele espessa, ou é coberto, parcial ou totalmente, por placas ósseas (Britski et al., 1988; Miranda e Ribeiro, 1997). A grande procura por essas espécies pode ocasionar a diminuição dos estoques naturais, e para que essas ações não causem

grandes prejuízos, é necessário que exista a produção dessas espécies de peixes em cativeiro.

1.2 Morfologia testicular

Pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva de *Pimelodus britskii* e, uma dos maiores entraves durante sua reprodução artificial é devido a dificuldade na obtenção de sêmen por apresentarem a anatomia testicular diferenciada, assim como outros Siluriformes (Nguenga et al., 1996). Morfologicamente, o sistema reprodutor masculino dos Siluriformes é distinto, podendo apresentar testículos com lóbulos digitiformes (Loir et al., 1989), testículos compactos sem lóbulos (Guimarães-Cruz e Santos, 2004; Melo et al., 2011), testículos com duas regiões, craniana espermatogênica e caudal secretora, ou ainda testículos com vesículas seminais acessórias (Loir et al., 1989; Santos et al., 2001).

Siluriformes como jundiá, *Rhamdia quelen* (Bombardelli et al., 2006), surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Canepelle, 2011), cascudo, *Rhinelepis aspera* (Sanchez et al., 2011) liberam sêmen a partir da indução hormonal e massagem na cavidade abdominal. Contudo, mesmo com a aplicação hormonal, infelizmente, para o mandi-pintado, *Pimelodus britskii*, bem como, outras espécies dessa ordem é necessário à remoção e maceração dos testículos para a coleta de sêmen, como em bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Polling et al., 1987; Rurangwa et al., 2000; Viveiros et al., 2002; Wagenaar et al., 2012), surubim-lima, mandi, *Pimelodus maculatus* (Sato et al., 1999), *Sorubim lima* (Shibatta et al., 2011), jaú, *Zungaro jahu* (Nogueira et al., 2012), e *Ictalurus furcatus* (Gima et al., 2013), prática esta utilizada nas piscigranjas. A dificuldade na obtenção de sêmen no momento da desova promove a utilização de um maior número de machos (Mylonas et al., 2010), elevando-se os custos da atividade (Romagosa, 2006; Romagosa, 2008).

1.3 Reprodução artificial

É sabido que a reprodução de peixes é dividida em duas fases, sendo que na primeira ocorre a proliferação, crescimento e diferenciação dos gametas, enquanto na segunda, compreende a maturação e preparação dos ovócitos e espermatozoides para serem liberados (Romagosa, 2006; 2008; Mylonas et al.,

2010). Porém, esse processo maturacional pode passar por problemas denominados de falhas ou disfunção reprodutiva, que nada mais é que o fracasso na produção de sêmen e/ou de ovócitos, sendo que em machos o maior problema é a produção de pouco sêmen e de baixa qualidade (Manãos et al., 2008), enquanto nas fêmeas as falhas reprodutivas podem ocorrer na maturação ovocitária, ovulação ou desova (Romagosa, 2006).

Em 1996, Donaldson realizou uma revisão sobre a reprodução artificial (induzida) de peixes dividindo-a em três fases tecnológicas: 1) nos anos 30, em que se induzia a maturação final dos peixes, ovulação e liberação de sêmen por meio de aplicação de glândula pituitária diluída em soro fisiológico. – método simples e prático. Os primeiros experimentos foram conduzidos von Ihering e colaboradores (1937), coletando hipófises de rã induziram peixes à espermiacção com dosagens crescentes e sucessivas; 2) na década de 70, iniciaram-se estudos com homólogos, gonadotrofinas de peixes parcialmente purificadas e gonadotrofina coriônica humana (hCG) e, 3) em meados de 1980, começaram a ser utilizados os análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH_a) com ou sem dopamina, e também antiestrógenos. Ambas os hormônios apresentam com altos níveis de LH (Zohar e Mylonas 2001), que atuam diretamente nas gônadas (Andrade et al., 2003). Outras substâncias indutoras desencadeiam estímulos na hipófise dos peixes, como é o caso de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), inibidores de dopamina, domperidona, pimozida e metoclopramida.

Desde então, a reprodução artificial passou a ser explorada intensamente, porém, sem grandes avanços em relação às manipulações hormonais. Para que as técnicas de produção acelerem é necessário que se faça com a Aquicultura o que já foi feito para mamíferos, desenvolver tecnologia de ponta que responda as inúmeras questões que existem sobre cada espécie de peixe estudada. A partir de então, os agentes indutores (hormônios naturais ou sintéticos) devem ser utilizados como ferramentas de gestão produtiva como, eficiência na produção de ovos, ampliação do período de espermiacção e facilitar os manejos incubatórios (Zohar e Mylonas, 2001; Romagosa, 2006; Romagosa, 2008; Mylonas et al., 2010; Phelps et al., 2011).

1.4 Qualidade dos gametas

A preocupação na produção de peixes se refere principalmente, a qualidade de ovócitos, desconsiderando-se de certa forma, a qualidade dos gametas masculinos, embora estes estejam diretamente ligados à produção de larvas saudáveis (Bromage & Roberts, 1995; Rurangwa et al., 2004). Embora a qualidade dos ovócitos possa ser definida como a habilidade de ser fertilizado e desenvolver um embrião normal (Bonnet et al., 2007) e, esta muitas vezes é avaliada quanto ao tamanho e aparência do ovócito, avaliação físico-química dos ovários e líquido celomático (Bobe & Labbé, 2009). Enquanto, entende-se por qualidade espermática, qualquer parâmetro quantificável que se correlacione com a capacidade do espermatozoide em fertilizar o ovócito, levando-se em consideração principalmente, a motilidade espermática (Rurangwa et al., 2004; Bobe & Labbé, 2009).

Na rotina da reprodução artificial, quando se trata de machos, o conhecimento das características seminais permite utilizar os gametas de forma racional (Bombardelli et al., 2006). Lahnsteiner (2000) ressalta ainda a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides para melhorar a produção de qualquer espécie de peixe quando mantidos em confinamento.

1.5 Parâmetros gametas masculinos

Tradicionalmente, destacam-se os parâmetros de qualidade espermática de peixes como, pH, concentração espermática, motilidade, morfologia, osmolalidade, espermatócrito, ultraestrutura, entre outros (Ninhaus et al., 2006; Sanches et al., 2010; Sanches et al., 2011).

Em peixes, o pH do sêmen e do plasma seminal é avaliado de forma simplificada, com fita tornasol ou pHmetro, e relaciona-se com a motilidade espermática e taxas de fertilização (Alavi et al., 2005). Logo, a concentração é facilmente aferida a partir de métodos tais como, espermatócrito, contagem microscópica, citometria e espectrofotometria (Alavi et al., 2005; Cabrita et al., 2008).

Nos últimos anos a motilidade espermática tem sido o foco das investigações, embora seja considerada uma análise subjetiva (Alavi et al., 2005) levando a inúmeros questionamentos quanto a sua validação, pois, depende principalmente, da experiência de quem realiza a análise (Sanches, 2009). Recentemente, por meio de softwares específicos vem sendo utilizado programas computacionais tais como, *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), na avaliação espermática de peixes (Rurangwa et al., 2001; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007; Sanches et al., 2013; Amann e Waberski, 2014).

O programa CASA é um sistema automático utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como, de subpopulações de células espermáticas (Amann e Katz, 2004). As análises morfológicas e de motilidade espermática têm sido apontadas como um instrumento importante na seleção do sêmen, sendo que a taxa de motilidade espermática é o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (Verstegen et al., 2002). A importância do programa CASA tem sido demonstrada em estudos sobre a otimização de gametas (Rurangwa et al., 2004).

2 Literatura consultada

Adebayo, O.T.; Fasakin, E. A.; Adewumi, J. A., 2012. Reproductive performance of partial gonadectomized male African catfish, *Clarias gariepinus* broodstocks. *Theriogenology*, **77**, 1050 – 1055.

Alavi, S.M.H., Cosson J.J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, **29**, 101-110

Amann R, Katz, D. F., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal Andrology*, **25**, 317-325.

Amann, R.P.; Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, **81**, 5-17.

Andrade, D.R., Yasui, G.S. 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **27**, 2, 166-172.

Baumgartner, G.; Pavanelli, C. S.; Baumgartner, D.; Bifi, A. G.; Debona, T.; Frana, V. A., 2012. *Peixes do Baixo Rio Iguaçu*. Eduem, Maringá. 1, 203p.

Bombardelli, R. A.; Mörschbacher, E. F.; Campagnolo, R.; Sanches, E. A.; Syperreck, M. A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardi, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, **35**, 1251-1257.

Bobe, J.; Labbé, C., 2009. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, **165**, 535-548.

Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J. 2007. Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*, **67**, 786–794.

Britski, H. A., Y. Sato & A. S. Rosa. 1988. Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias. 3ªEd. Brasília, Ministério da Irrigação, CODEVASF, vi+115 p.

Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), 1995. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science Ltd., Oxford, 424 p.

Cabrita E, Robles V, Harráez P. Sperm quality assessment. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P, editors. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*, New York: Taylor & Francis Groups; 2008, p. 93-147.

Caneppele, D. 2011. *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) (Siluriformes: Pimelodidae): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA, SAA, SP. como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca. 70p.

Donaldson, E. M.; Hunter, G. A., 1983. *Induced final maturation, ovulation, and spermiation*. In: Hoar, W. S. *Fish Physiology*. Orlando: Academic Press, 352–403.

Garavello, J. C.; Shibatta, O. A., 2007. A new species of the genus *Pimelodus* (LA CÉPÈDE, 1803) from do rio Iguaçu basin and a reappraisal of (*Pimelodus ortmani*) (Haseman, 1911) from de rio Paraná system, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, **5** (3) 282-292.

Gima, M.E., Gima, A., Hutson, A., Chaimongkol, A., Beam, R., Perera, D.A., Dunham, R.A. 2013. Realized heritability and response to selection for fecundity, hatching rate and fry/Kg for channel catfish females (*Ictalurus punctatus*) induced to ovulate and fertilized with blue catfish (*Ictalurus furcatus*) males for the production of hybrid catfish embryos. *Aquaculture*, 24-30.

Guimarães-Cruz, R. J.; Santos, J, E., 2004. Testicular structure of three species of neotropical freshwater Pimelodids (Pisces, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **21** (2), 267-271.

Lahnsteiner, F., 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiology and Biochemistry*, **23**, 107– 118.

Loir, M.; Cauty, C.; Planquette, P.; Le Bail, P.Y., 1989. Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquatic Living Resourche*, **2**, 45-56.

Melo, R. M. C.; Arantes, F. P.; Sato, Y.; Santos, J. E. dos; Rizzo, E.; Bazzoli, N., 2011. Comparative Morphology of the Gonadal Structure Related to Reproductive Strategies in Six Species of Neotropical Catfishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Morphology*, **272**: 525–535.

Mylonas, C. C.; Fostier, A.; Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, **165**, 516–534.

Nguenga, D., Breine, J.J., Teugels, G.G., Ollevier, F., 1996. Artificial propagation of the African catfish *Heterobranchus longifilis* (Siluroidei, Clariidae): description of a simple technique to avoid sacrificing male broodstock for the obtention of milt. *Aquaculture*, **143**, 215–217.

Ninhaus-Silveira, A.; Foresti, F.; Veríssimo-Silveira, R.; Senhorini, J. A., 2006. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49** (4), 651-659.

Nogueira, L. B.; Azevedo, P. G.; Canelhas, M. R.; Bedore, A. G.; Lopes, J. M.; Godinho, H. P., 2012. Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, **10** (1), 89-98.

Phelps R. P.; Hastey, R.; Broach, J.; Pendetar, A.; Linley, L.; Papanikos, N.; Dunham, R. A., 2011. Broodstock Selection Criteria for Induced Spawning of Channel Catfish for the Production of Channel × Blue Catfish Hybrid Fry and the Influence of Temperature North American. *Journal of Aquaculture*, **73**, 180–186.

Pinna, M.C. 1998. *Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii): Historical overview and synthesis of hypotheses*. 279-330 p. In: Malabarba, L.R.; R.R Reis; R.P. Vari; Z.M.S. Lucena, y C.A. Lucena. 1998. Phylogeny and classification of Neotropical fishes.

Polling, L.; van der Waal, B.C.W.; Schoonbee, H.J., 1987. Improvements in the large scale artificial propagation of the sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), in South Africa. *South African Journal of Animal Science*, **17**, 176–180.

Ribeiro, F. R.; Lucena, C. A. S., 2006. A new species of *Pimelodus* La Cépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **4** (4): 411-418.

Romagosa, E. 2008. *Avanços na reprodução de peixes migradores*. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati E.C. (Eds.) Tópicos Especiais em Biologia Aquática e

Aqüicultura. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, SP, 2008. p.1-16.

Romagosa, E. 2006. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. (Eds). Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, SP, 2006. p.107-116.

Rurangwa, E.; Volckaert, F. A. M.; Huyskens, I. 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 Catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, **55**, 751-769.

Rurangwa, E.; Kime, D. E., Ollevier, F.; Nash, J. P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, **234**, 1-28.

Sanches, E.A.; Bombardelli, R.A.; Baggio, D.M.; Souza, B.E., 2009. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **38** (11), 2091-2098.

Sanches, E. A.; Bombardelli, R. A.; Marcos, R. M.; Neumann, G.; Toledo, C. P. R.; Romagosa, E, 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research*, **42**, 153-156.

Sanches, E. A.; Bombardelli, R. A.; Baggio, D.M.; Sykora, R.M.; Xavier, A.M.M., 2011. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **35** (3) 357-362.

Sanches, E.A., Marcos, R.M., Okawara, R.Y., Caneppele, D., Bombardelli, R.A., Romagosa, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal Applied Ichthyology*, **29**, 1114-1122.

Santos, J. E.; Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Santos, G. B., 2001. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys*

labrosus (Lu Ètken, 1874) (Siluriformes:Pimelodidae). *Tissue & Cell*, **33** (5) 533-540

Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Verani, J. R.; Godinho, H. P.; Sampaio, E. V., 1999. Reproductive traits of the yellow-mandi catfish, *Pimelodus maculatus* Lacepede (Osteichthyes, Siluriformes) in captive breeding. *Revista Brasileira de Zoologia*, **16** (4), 981- 986.

Shibatta, O. A.; Novelli, J. L.; Dias, J. H. P.; Britto, S. G. C.; Filho, M. C., 2011. Reprodução em cativeiro do jurupecê *Sorubim lima* (Siluriformes, Pimelodidae) por meio de indução hormonal. *Semina: Ciências Agrárias*, **32** (1), 363-372.

Verstegen J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, **57**,149-179.

Viveiros A. T. M.; Fessehay, Y.; ter Veld, M.; Schulz, R.W.; Komen, J., 2002. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **213**, 373–386.

von Ihering, R. 1935 Ihering RV. Die wirkung von Hypophyseinjektion auf den Laichakt von Fischen. *Zool Anz*, **111**, 273-279.

Wagenaar, G.; Botha, T.; Barnhoorn, I., 2012. Sperm motility and testicular histology as reproductive indicators in *Clarias gariepinus* from an eutrophic impoundment, South Africa. *Journal Applied of Ichthyology*, **28**, 990–997.

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, **67**, 661–672.

Zohar, Y., Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, **197**, 99–136.

3 ARTIGO:

**O Artigo será encaminhado a *Theriogenology*, normas disponíveis em:
<http://www.elsevier.com/locate/inca/525024/authorinstructions>**

ISSN: 0093-691X

Fator de impacto: 2,082

**INDUÇÃO À ESPERMIAÇÃO DE *Pimelodus britskii* (Teleostei: Pimelodidae)
NO PERÍODO REPRODUTIVO**

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o sêmen de *Pimelodus britskii* através de diferentes métodos de coleta e doses hormonais. O experimento foi executado em dois períodos reprodutivos, novembro/2011 a março/2012 e outubro/2012 a março/2013. No primeiro período reprodutivo (Experimento 1) em todos os meses 12 peixes foram divididos em dois grupos, um grupo induzido com Extrato Hipofisário de Carpa-EHC ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) e um grupo sem indução hormonal, após 240 unidades térmicas acumuladas-UTAs os peixes dos dois grupos foram eutanasiados e tiveram seus testículos macerados. No segundo período reprodutivo (Experimento 2) 30 peixes foram divididos em cinco grupos para comparação de diferentes doses de EHC e Gonadotrofina Coriônica humana-hCG na espermição (T1: controle; T2: $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC; T3: $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}+3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC; T4: $0,5\text{mg.kg}^{-1}+7,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC; T5: 200UI.kg^{-1} hCG), sendo que neste período os mesmos peixes foram utilizados todos os meses, e após 240 UTAs o sêmen foi coletado através de massagem abdominal. Foram avaliadas a motilidade e velocidade espermática por meio do software CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). As variáveis seminais por meio do Statistica 7.0. Por meio da maceração, verificou-se alterações na cor (branco a amarelado), pH (6 a 7) e concentração espermática ($11,9 \times 10^9 \pm 4,16 \times 10^9$ a $9,15 \times 10^9 \pm 3,55 \times 10^9$ espermatozoides/ mL^{-1}). O volume mostrou relação entre meses e tratamentos ($p < 0,05$). Para todos os exemplares a motilidade foi superior em nov/2011, diminuindo gradativamente até fev/2012. O mesmo ocorreu em relação aos valores dos IGS ($p < 0,05$), mostrando a ação da indução hormonal no volume seminal. Os peixes do Experimento 1 liberaram volume reduzido de sêmen ($< 0,1 \text{ mL}$), translúcido e

aquoso. Em jan/2013 a velocidade espermática foi superior para o T4 com médias e $84,56 \pm 8,44 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p < 0,05$). O tratamento com hCG exibiu motilidade espermática inferior aos de EHC, exceto em fev/13. A velocidade espermática foi superior a $80,00 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ para os três tratamentos (exceto T4, $69,18 \pm 26,41 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) ($p < 0,05$). Os valores de concentração espermática, motilidade e velocidade espermática diminuíram gradativamente ao longo dos meses avaliados. Para *P. britskii* o período reprodutivo influenciou a produção e qualidade espermática. Apesar do pequeno volume seminal liberado, a dose T4: $7,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de EHC mostrou-se eficaz.

Palavras-chave: características seminais; ciclo reprodutivo; extrato de hipófise de carpa; gonadotrofina coriônica humana; produção de sêmen; qualidade sêmen.

Abstract

The aim of this study was to characterize the semen *Pimelodus britskii* through different collection methods and hormonal doses. The experiment was run in two reproductive periods, November/2011 to March/2012 and October/2012 to March/2013. In the first breeding season (Experiment 1) in all months 12 fish were divided into two groups, one experimental group with Carp Pituitary Extract - EHC (3.0 mg.kg^{-1}) and a group without hormonal induction, after 240 units accumulated thermal-UTA fish from both groups were euthanized and had their macerated testes. In the second reproductive period (Experiment 2) 30 fish were divided into five groups for comparison of different doses of human Chorionic Gonadotropin-hCG and EHC in spermiation (T1: Control, T2: $3,0\text{mg.kg}^{-1}$ EHC, T3: $0,5 \text{ mg.kg}^{-1} + 3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC , T4: $0,5 \text{ mg.kg}^{-1} + 7,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC , T5: 200UI.kg^{-1} hCG) , and in this period the same fish were used every month, and after 240 UTA semen was collected by abdominal massage. Motility and sperm velocity were evaluated through the CASA software (Computer Assisted Sperm Analysis). The seminal variables using Statistica 7.0. Through the soaking, there was color change (white to yellow), pH (6 to 7) and sperm concentration ($11,9 \times 10^9 \pm 4,16 \times 10^9$ to $9,15 \times 10^9 \pm 3,55 \times 10^9$ spermatozoa/ mL^{-1}). The volum months showed relationship between treatments ($p < 0,05$). For all copies motility was higher in November/2011, decreasing gradually until February/2012. The same occurred with the values of the IGS ($p < 0,05$), showing the action of hormonal induction in seminal volume. The fish released Experimento1 reduced semen volume ($< 0,1 \text{ mL}$), translucent and watery. In January/2013 sperm velocity was higher for medium and T4 with $84,56 \pm 8,44 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$ ($p < 0,05$). Treatment with hCG exhibited inferior to EHC

sperm motility, except fev/13. The sperm velocity was greater than $80,00\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for the three treatments (except T4 $69,18 \pm 26,41\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ($p < 0,05$). The values of sperm concentration, motility and sperm velocity decreased gradually over the months evaluated. For *P. britskii* the reproductive period influenced the production and sperm quality. Despite the small seminal volume released, the T4 dose: $7,5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ EHC was effective.

Key-words: seminal characteristics; reproductive cycle; carp hypophysis extract; human chorionic gonadotrophin; semen production; semen quality.

4 Introdução

As características reprodutivas dos peixes modificam sazonalmente, e em machos essa sazonalidade é verificada por meio do volume seminal, número de células, motilidade e mudanças ao longo do período reprodutivo [1]. Muitas espécies de peixes exibem falhas ou disfunções reprodutivas quando criadas em cativeiro [2]. Manipulações dos parâmetros ambientais e hormonais refletem na eficiência reprodutiva, entretanto, em algumas espécies de peixes os tratamentos hormonais são ineficientes [3]. Em geral, os Siluriformes liberam sêmen a partir da indução hormonal e massagem na região da cavidade abdominal [4,5]. Mas em casos extremos, uma única alternativa, mesmo com a aplicação hormonal, é a remoção dos testículos, onde é necessário macera-los para a coleta do sêmen, como em, *Clarias gariepinus* [6, 7], *Ictalurus furcatus* [8], *Sorubim lima* [9], *Zungaro jahu* [10], *Pimelodus maculatus* [11]. A dificuldade na obtenção de sêmen no momento da desova promove a utilização de um número maior de machos [12], elevando-se os custos da atividade [13] com a manutenção dos reprodutores.

Sabe-se que morfológicamente, o sistema reprodutor masculino da maioria dos Siluriformes de água doce é distinto de outras ordens de peixes, frente a grande diversidade reprodutiva da família, particularmente, no que diz respeito à anatomia dos testículos [14,15], apresentando características inerentes ainda pouco conhecidas, podendo apresentar testículos com franjas digitiformes [16], testículos compactos sem franjas [17] testículos com duas regiões, craniana espermatogênica e caudal secretora, ou ainda testículos com vesículas seminais acessórias [18,19]. Segundo Romagosa [20] para o

sucesso das técnicas reprodutivas artificiais de uma espécie de peixe é fundamental que se conheça o ciclo reprodutivo das espécies. Porém, em *Pimelodus britskii*, da família Pimelodidae e ordem dos Siluriformes, espécie endêmica do rio Iguaçu, Paraná, Brasil [21], apresenta a mesma dificuldade na liberação de sêmen verificada nas espécies citadas anteriormente, devido ao grande número de franjas presentes nos testículos. São escassos os estudos realizados com essa espécie.

O aumento da demanda por espécies de peixes nativos, a exigência dos piscicultores por métodos de produção mais sustentáveis e saudáveis e de menor impacto no meio ambiente [22,20,13] fizeram com que uma especial atenção tenha sido dada à produção de sêmen do *P. britskii*. Portanto, este trabalho objetivou caracterizar o sêmen do *P. britskii*, sendo os peixes induzidos hormonalmente ou não, ao longo do período reprodutivo por meio de diferentes metodologias.

5 Material e métodos

5.1 Espécie e local de estudo

Neste estudo foram utilizados 90 machos de *Pimelodus britskii*, sendo que 60 foram utilizados no experimento 1, e 30 utilizados no experimento 2. Os peixes foram capturados nos reservatórios de Salto Osório e Salto Santiago, ambos localizados no rio Iguaçu, Paraná/Brasil. Os peixes foram aclimatados em dois tanques escavados de concreto com fundo de terra (20 x 10 x 1,5 m cada), no período de novembro de 2011 a março de 2013, no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), sendo que a execução do experimento foi no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais

Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), ambos pertencentes a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, localizado no município de Toledo/Paraná, Brasil (24° 46' 48,11"S; 53°43'25.77"W). Os peixes receberam ração comercial peletizada, 32% PB, duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Este experimento possui parecer favorável do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/Unioeste, conforme protocolo 03112, Ata 06-2012.

5.2 Condução do experimento

Experimento 1

Devido a dificuldade encontrada para a obtenção de sêmen nesta espécie, optou-se por utilizar a metodologia da maceração, utilizada anteriormente para *Clarias gariepinus* e *Zungaro Jahu* [6,9], espécies que apresentam as mesmas dificuldades. Para tal, foram utilizados 60 machos de *P. britskii*, com médias de 19,87±3,56cm e 0,07±0,03kg, mensalmente 12 peixes foram avaliados, sendo seis peixes induzidos com 3,0 mg.kg⁻¹ EHC [23] e, seis sem aplicação hormonal, e mantidos no laboratório em tanques de 1000L, com aeração constante e temperatura controlada (±24°C). A caracterização seminal realizada entre os meses novembro/2011 a março/2012, foi realizada por meio de aplicação hormonal do Extrato Hipofisário de Carpa (EHC) e, posteriormente, os testículos foram removidos e macerado para coleta de sêmen.

Após 240 o intervalo de 240 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) os peixes foram eutanasiados com solução de benzocaína (250 mg.L⁻¹) de acordo

com a lei do Conselho Federal de Medicina Veterinária [24], e em seguida, realizou-se uma incisão na região da cavidade abdominal para a retirada dos testículos, pesados (g) para o cálculo do Índice Gonadossomático ($IGS = \text{peso dos testículos} / \text{peso total do peixe} \times 100$). Logo, os fragmentos dos testículos foram colocados em uma seringa adaptada com uma tela de 500 micra e macerados com auxílio do êmbolo (Figura 2). O sêmen foi coletado em seringas, e mantidos em caixa de isopor com gelo ($\pm 12^{\circ}\text{C}$) [adaptado de 25] até o fim das análises seminais e espermáticas. Os testículos e suas franjas foram medidas com paquímetro.



Figura 2. Detalhes de uma seringa adaptada para a maceração dos testículos.

Experimento 2

Este experimento foi realizado a fim de avaliar as características seminais do *P. britskii* induzidos com diferentes hormônios (EHC e Gonadotrofina Coriônica Humana – hCG) em diferentes concentrações na tentativa de que houvesse liberação de sêmen sem a necessidade de sacrificar os animais, ao longo de um período reprodutivo [26]. Para isso foram utilizados 30 machos de *P. britskii*, com médias de $26,3 \pm 4,6\text{cm}$ e $0,19 \pm 0,01\text{kg}$, marcados eletronicamente com transponders (TAGs), distribuídos em um delineamento experimental em estrutura fatorial (5X6). Mensalmente, outubro/2012 a

março/2014, os mesmos peixes foram levados para o laboratório e acondicionados em tanques de 1000L, com aeração constante e temperatura controlada ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) e, receberam os seguintes tratamentos hormonais:

Tratamento 1) 0 mg.kg^{-1} EHC (controle);

Tratamento 2) $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC (única dose);

Tratamento 3) $3,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC (dose prévia $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC e após aproximadamente 288 UTA a 2ª dose de $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC);

Tratamento 4) $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC (dose prévia $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC e após aproximadamente 288 UTA uma 2ª dose de $7,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC);

Tratamento 5) 200 UI.kg^{-1} hCG (única dose).

Os hormônios foram diluídos em soro fisiológico, aplicado via intramuscular. Cada animal foi considerado como uma unidade experimental. Durante as coletas foram verificadas as numerações eletrônicas e repetidas as pesagens individuais.

As coletas de sêmen foram realizadas após o intervalo de 240 UTAs [4,27], para isso os machos foram anestesiados com solução de benzocaína (75 mg.L^{-1}), em seguida, contidos e secos com pano e papel toalha, e para eliminar os riscos de contaminação como a urina a primeira gota de sêmen foi desprezada [28]. O sêmen foi coletado em seringas, e mantidos nas mesmas condições do sêmen do Experimento 1.

5.3 Análises do sêmen

O sêmen obtido foi submetido às seguintes análises seminais:

(1) Coloração do sêmen: mensurada a partir de uma análise subjetiva, sendo enquadrada em uma escala de cor que varia entre branco leitoso, translúcido, transparente e amarelado [29]; (2) pH: foi aferido a partir do método colorimétrico [25]; (3) Concentração espermática: mensurada a partir da diluição de sêmen em formol salino-tamponado (1:1000) e contagem por meio de câmara hematimétrica de Neubauer [30]. (4) Motilidade espermática (%) e Velocidade Espermática: analisadas por meio do software livre CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). O sêmen foi ativado com água destilada (1 μ L sêmen: 400 μ L água), e avaliado sob microscópio de luz (obj. 40 x). O tempo total de motilidade foi considerado o tempo que todos os espermatozoides levaram para cessar o movimento, com três repetições para cada amostra. No mesmo instante que a motilidade, foram obtidos os valores de velocidade curvilínea, velocidade média de deslocamento e velocidade em linha reta do espermatozoide. Neste estudo as velocidades estão altamente interrelacionadas, portanto, foram submetidas a uma análise de componentes principais (PCA) [31]. O processamento dos vídeos foi realizado baseado na descrição dos componentes necessários para a utilização do aplicativo CASA por meio de software livre [32], porém, as configurações utilizadas para a análise foram adaptadas para espécie. (5) Taxa de normalidade espermática: 500 μ L de espermatozoides foram fixados em formol salino tamponado (1:1000 espermatozoides:fixador), e posteriormente corado com rosa de bengala [31]. Em uma das extremidades da lâmina de vidro foram depositadas duas gotas de 10 μ L da solução fixada, mantida inclinada para que as gotas deslizassem até a outra extremidade da lâmina, em seguida, deixada para secar ao ar livre, e então, analisadas em microscópio de luz (obj. 40x) [4].

Foram contados 300 espermatozoides e classificados em normais e anormais [33].

6 Análise estatística

Os valores médios do IGS, bem como, as variáveis seminais foram avaliados por meio do *software* Statistica 7.0 ®. Para atender os pressupostos de homogeneidade e normalidade, os dados de volume e concentração espermática foram transformados em log 10 e arcoseno da raiz. Os resultados do experimento 1 foram submetidos à análise fatorial. Enquanto os resultados do experimento 2 foram submetidos à análises *One Way*, devido a característica desbalanceada. Quando significativos ($p < 0,05$), os resultados foram avaliados com Teste de Duncan.

7 Resultados

7.1 Experimento 1

Os testículos do *P. britskii* são pareados de mesmo tamanho, localizados dorsalmente na cavidade celomática. Os testículos apresentam franjas de diferentes tamanhos com média de 0,52 as franjas da região caudal, 0,75 as franjas da região intermediária e 1,17 as franjas da região cranial. Sendo que a região caudal aparentemente corresponde a secreção de fluidos enquanto as regiões intermediária e abdominal correspondem a produção espermática, variando de branco amarelado a rosado transparente (Figura 3).

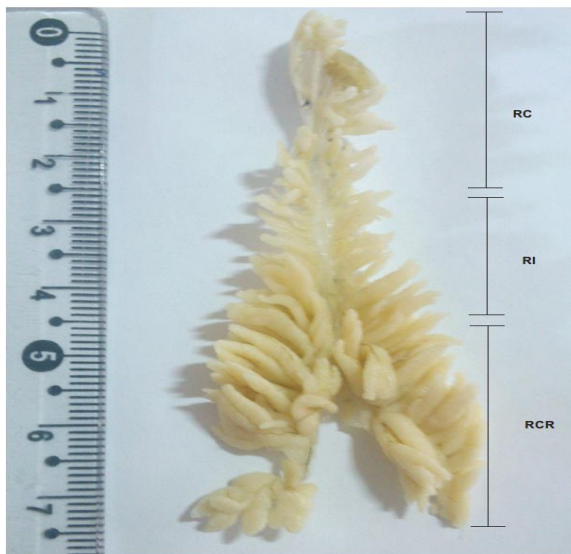


Figura 3. Testículo do mandi-pintado, *P. britskii*, dividido em três regiões. RC: região caudal, RI: região intermediária e RCR: região cranial.

O sêmen obtido por meio desta prática apresentou aspecto leitoso variando entre branco e amarelado. Os valores médios do pH seminal apresentaram amplitudes variando entre 6 e 8, sendo que a média para o sêmen de animais induzidos foi de 6,0 e os de não-induzidos 7,0. Estes valores foram significativamente diferentes em tratamentos e meses ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Durante os cinco meses da realização do experimento 1 constatou-se que o volume obtido por meio da maceração apresentou correlação entre meses e tratamentos ($p < 0,05$). Os peixes que receberam indução hormonal produziram maior volume seminal nos meses de novembro/2011 e março/2012. A dose hormonal utilizada (única dose) provocou um aumento no fluido seminal e, também, no número de células espermáticas de *P. britskii*. Os valores da concentração espermática não diferiram significativamente ao longo do tempo, apresentando médias de $11,9 \pm 4,16 \times 10^9$ (espermatozoides/mL¹) para peixes-induzidos e $9,15 \pm 3,55 \times 10^9$ (espermatozoides/mL⁻¹) não-induzidos, porém

houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os peixes induzidos apresentaram maiores médias de concentrações espermáticas quando comparados aos não-induzidos.

A Tabela 3 mostra que os valores médios de motilidade espermática de *P. britskii* foram significativamente superiores para o sêmen de peixes induzidos ao longo do período reprodutivo. Para o sêmen do total de exemplares (induzidos + não-induzidos) os valores de motilidade foram superiores em novembro/2011 e, diminuíram gradativamente até fevereiro/2012, porém em março/2012 houve uma nova ascensão, com altas taxas de motilidade espermática. Os valores médios da velocidade espermática do *P. britskii* apresentaram interação entre meses e tratamentos, constatando que os peixes induzidos no mês de janeiro/2012 apresentaram valores significativamente superiores aos não-macerados.

Foi evidente a diferença dos valores nos tempos totais da ativação espermática de *P. britskii* entre os meses e tratamentos hormonais, e também na relação entre meses e tratamentos ($p < 0,05$). O sêmen dos peixes induzidos apresentaram tempos de motilidade superiores principalmente, nos meses de dezembro/2011 e janeiro/2012, e esse tempo de motilidade diminuiu expressivamente em fevereiro e março/2012.

Os valores médios da normalidade espermática de *P. britskii* foram superiores para os peixes induzidos principalmente, no mês de novembro/2011 ($49,59 \pm 2,84\%$) e diminuíram progressivamente ao longo do período reprodutivo. Os peixes não-induzidos tiveram aumento significativo na normalidade espermática somente em março/2013 ($21,91 \pm 2,70\%$).

Tabela 1: Variáveis seminais e espermáticas dos *P. britskii*, em relação aos tratamentos hormonais e período de novembro/2011 a março/2012.

Variáveis seminais e espermáticas	Tratamentos/Meses									
	T2: Macerados-induzidos					Controle: Macerados não-induzidos				
	Nov/11	Dez/11	Jan/12	Fev/12	Mar/12	Nov/11	Dez/11	Jan/12	Fev/12	Mar/12
Volume (mL ⁻¹)	0,49±0,25 ^{ab}	0,36±0,18 ^{ab}	0,23±0,10 ^{ab}	0,24±0,08 ^{ab}	0,49±0,47 ^b	0,18±0,06 ^{ab}	0,17±0,05 ^{ab}	0,16±0,07 ^{ab}	0,12±0,06 ^a	0,21±0,11 ^{ab}
pH	6,00±0,57 ^b	6,00±0,00 ^{ab}	6,00±0,00 ^{ab}	6,00±0,00 ^{ab}	6,00±0,00 ^{ab}	7,00±0,00 ^{ab}	7,00±0,51 ^{ac}	7,00±0,00 ^{ab}	7,00±0,00 ^{ab}	7,00±0,54 ^c
Conc(sptz.mL ⁻¹)*	14,1±8,67 ^a	11,0±4,27 ^a	11,7±1,89 ^a	11,0±0,42 ^a	12,5±4,53 ^a	5,73±6,49 ^b	10,9±2,39 ^b	10,7±2,78 ^b	7,95±3,61 ^b	10,8±3,25 ^b
Mot (%)	62,18±26,24 ^a	55,87±15,77 ^a	47,44±19,84 ^a	44,13±18,67 ^a	48,46±5,49 ^a	59,15±8,98 ^a	21,24±19,59 ^b	18,60±4,67 ^b	18,55±7,58 ^b	48,28±21,52 ^a
Vel (µm.s ⁻¹)	68,75±12,06 ^{abc}	68,78±5,46 ^{abc}	71,27 ±7,06 ^c	63,20 ±6,51 ^{abc}	65,21±6,91 ^{abc}	72,38 ±13,35 ^{bc}	55,39±11,06 ^{ab}	48,16±2,17 ^a	61,75±15,17 ^{abc}	65,35±11,32 ^{abc}
TTA (s)	60,00±8,16 ^a	99,16±17,44 ^b	119,05±41,93 ^b	49,44±4,90 ^a	58,99±9,69 ^a	64,00±8,30 ^a	66,09±9,74 ^a	54,99±5,05 ^a	48,05±10,02 ^a	64,00±10,38 ^a
Norm (%)	49,59±2,85 ^d	40,82±14,95 ^{cd}	24,85±6,16 ^{abc}	14,66±12,21 ^{ab}	12,95±6,62 ^{ab}	33,55±19,54 ^{bcd}	11,06±4,58 ^{ab}	5,57±4,66 ^a	4,04±2,67 ^a	21,91±21,98 ^{abc}

Tratamentos: testículos macerados, dose única de 3 mg.kg⁻¹; testículos macerados não-induzidos. * Conc: Concentração espermática x10⁹ espermatozoides.mL⁻¹; Mot: motilidade; Vel: velocidade; TTA: tempo total de ativação; Norm: normalidade.

O peso dos testículos de *P. britskii* sugere que ao longo do período reprodutivo houve um maior percentual de sêmen nos meses de novembro e dezembro/2011, entretanto, a partir do mês de janeiro/2012 esses valores começaram a diminuir lentamente (Figura 5). Os peixes induzidos apresentaram os valores médios do IGS mais elevados quando comparados aos não-induzidos ($p < 0,05$), mostrando a ação da indução hormonal no volume seminal do *P. britski*.

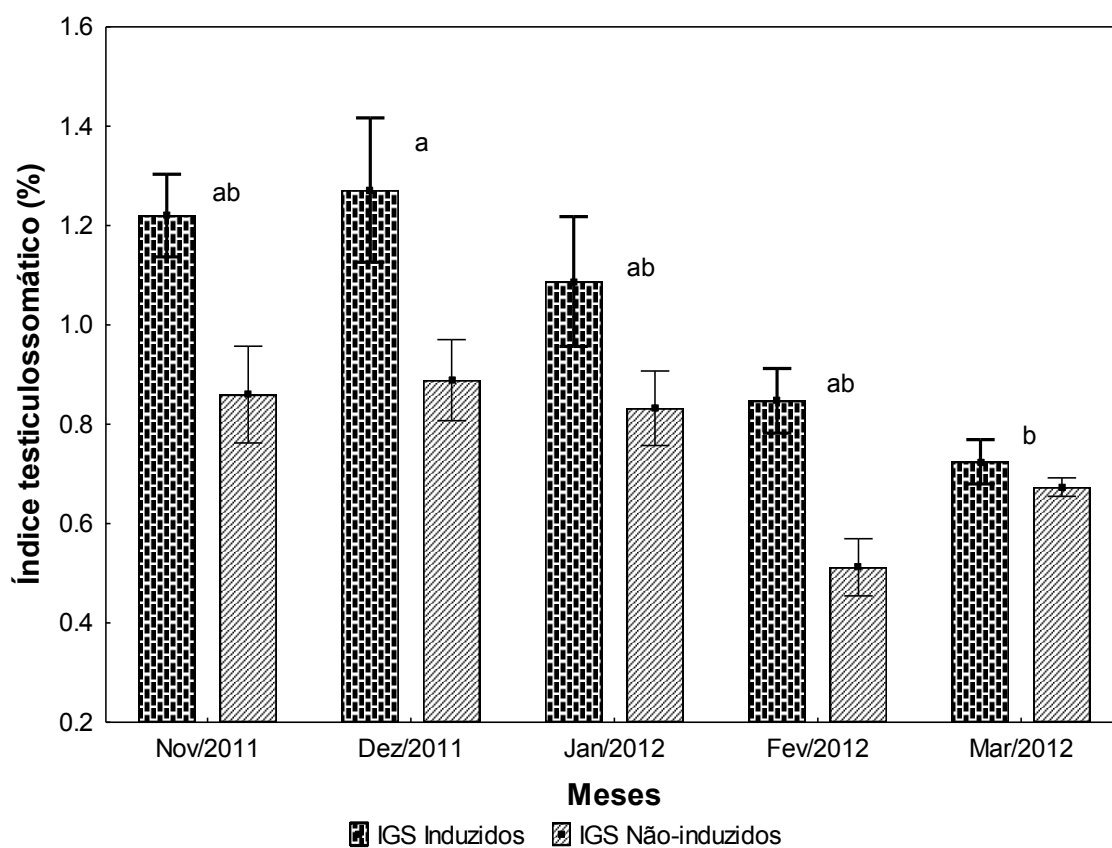


Figura 4. Índice testículossomático (IGS, %) dos *P. britskii*, ao longo do ciclo reprodutivo.

7.2 Experimento 2

Nos meses de outubro e novembro/2012 não houve liberação de sêmen dos *P. britskii* avaliados para os cinco tratamentos hormonais. A partir de dezembro/2012 somente os peixes que receberam os T3 e T4 (duas doses de EHC) iniciaram a liberação de sêmen. Na avaliação da coloração do sêmen observou-se que quando o sêmen foi obtido por meio de massagem abdominal apresentava aspecto translúcido e aquoso. Os valores médios do pH variaram entre 6 e 8, e não foi diferente significativamente entre os meses ou tratamentos. Durante os meses estudados, os peixes induzidos com o Tratamento 4 foram os que responderam à indução hormonal de forma positiva (Tabela 2).

Os valores da concentração espermática diferiram significativamente entre os meses, sendo que em fevereiro e março/2013 as concentrações foram inferiores aos demais meses (Figura 3A). Não houve diferença significativa na relação entre os tratamentos e meses ($p > 0,05$). Os valores de concentração do sêmen provenientes dos testículos macerados foram significativamente superiores as concentrações espermáticas do sêmen coletado por meio de massagem abdominal ($p < 0,05$) devido a obtenção de espermatozoides de todo o testículo, porém, a alta concentração espermática pode ser decorrente de um grande número de outras células que não fossem espermatozoides e que ficaram no sêmen após a maceração.

Tabela 2. Variáveis seminais e espermáticas dos *P. britskii* submetidos aos cinco tratamentos hormonais no período de novembro/2012 a março/2013.

Trat	Meses	n*	Volum e (mL)	pH	Conc (sptz.mL ⁻¹)	Mot (%)	Vel ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	TTA (s)	Norm (%)
T1	Dez/12	0	0	-	-	-	-	-	-
	Jan/13	0	0	-	-	-	-	-	-
	Fev/13	0	0	-	-	-	-	-	-
	Mar/13	0	0	-	-	-	-	-	-
T2	Dez/12	0	0	-	-	-	-	-	-
	Jan/13	1	-	7,00±	-	93,45±2,92	56,69	75,00	-
	Fev/13	2	-	0,00	5,01±0,90	88,78±12,1	6	46,66±	81,46±4,36
	Mar/13	0	0	-	-	-	-	-	-
T3	Dez/12	1	0	6,50±	11,6	94,50	87,34	100,00	91,29
	Jan/13	2	0,03	7,00±	9,99±1,36	93,46±3,20	80,08±	75,00±	92,32±5,42
	Fev/13	4	0,02	7,00±	3,09±0,50	89,05±2,87	90,08±	53,33±	74,27±10,21
	Mar/13	2	0,005	7,00±	0,27±0,09	73,41±24,4	60,24±	47,50±	88,00±5,39
T4	Dez/12	5	-	7,00±	10,9±2,01	80,62±5,34	50,56±	35,00±	82,78±10,46
	Jan/13	2	0,1	7,00±	11,8±2,65	96,25±1,37	7,09	7,07	77,78±12,59
	Fev/13	6	0,04	7,00±	0,95±0,962	83,83±9,80	84,56±	58,09±	72,71±5,39
	Mar/13	6	0,01	7,16±	0,29±0,16	77,84±0,00	80,45±	47,38±	72,27±5,71
T5	Dez/12	0	0	-	-	-	-	-	-
	Jan/13	1	0,06	7,00±	11,6	42,22	36,37	30,00	79,52
	Fev/13	2	0,03	7,00±	5,61±2,07	94,49±2,02	85,67±	63,33	83,73±8,14
	Mar/13	2	0,005	7,00±	0,25	53,16±57,3	51,06±	44,17	56,00±15,32

*n= número de peixes que liberaram sêmen por meio de massagem na região abdominal. T1) controle; T2) 3,0 mg EHC.kg⁻¹; t3) 0,5 + 3,0 mg EHC.kg⁻¹; t4) 0,5 + 7,0 mg EHC/kg⁻¹; T5) 200 UI hCG/kg-1. Trat: tratamento; Conc: concentração espermática; Mot: motilidade; Vel: velocidade espermática TTA: tempo total de ativação; Norm: normalidade.

Todavia, a motilidade espermática se manteve similar para o sêmen de peixes induzidos com duas doses hormonais (T3 e T4), sendo que os valores médios foram diminuindo gradativamente no decorrer do período reprodutivo. Os peixes do T5 (hCG) exibiram em todos os meses uma motilidade espermática inferior aos que receberam EHC, exceto em fevereiro/2013, onde o sêmen proveniente da indução com Gonadotrofina Coriônica humana apresentou motilidade superior a 95% (Figura 3B).

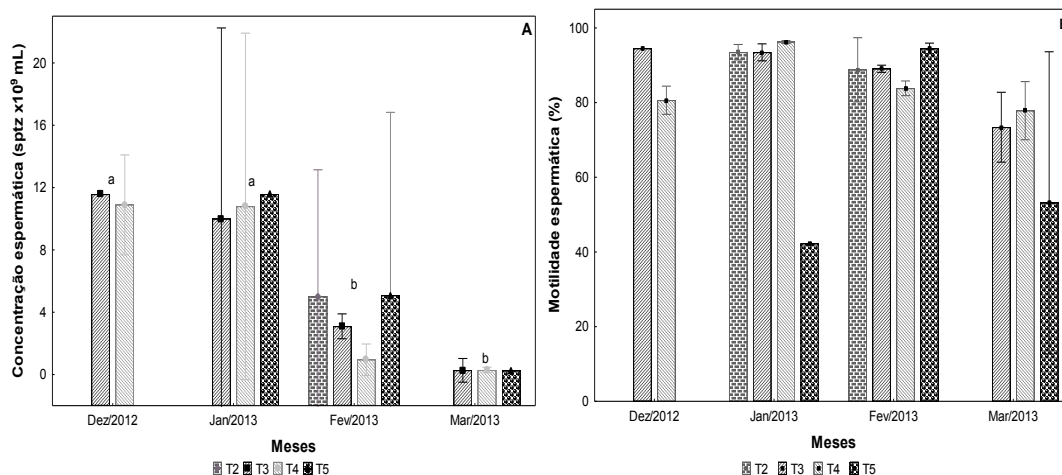


Figura 5. A) Concentração e B) motilidade espermática dos *P. britskii*, submetidos ao Etapa1 durante o experimento. [Tratamentos: T2) dose única 3 mg.kg⁻¹ EHC; T3) dose prévia 0,5 mg.kg⁻¹ EHC, 2^a dose 3 mg.kg⁻¹; T4) dose prévia 0,5 mg.kg⁻¹ 2^a dose 7mg.kg⁻¹; T5) dose única 200 UI hCG.kg⁻¹].

Em janeiro/2013 as velocidades espermáticas foram significativamente superiores para o T4 ($p < 0,05$) com média de $84,56 \pm 8,44 \mu\text{m.s}^{-1}$. No mês de fevereiro/2013 os quatro tratamentos apresentaram médias de velocidade espermática superiores a $80,00 \mu\text{m.s}^{-1}$. Em março/2013, o sêmen do T4 apresentou médias superiores de velocidade espermática ($69,18 \pm 26,41 \mu\text{m.s}^{-1}$) porém, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4A). Houve grande amplitude nos valores de velocidade espermática.

Em janeiro/2013 os valores do tempo total de ativação dos espermatozoides apresentaram-se significativamente superiores quando comparados a março/2013 ($p < 0,05$), porém, essa diferença não foi significativa entre os tratamentos (Figura 4B).

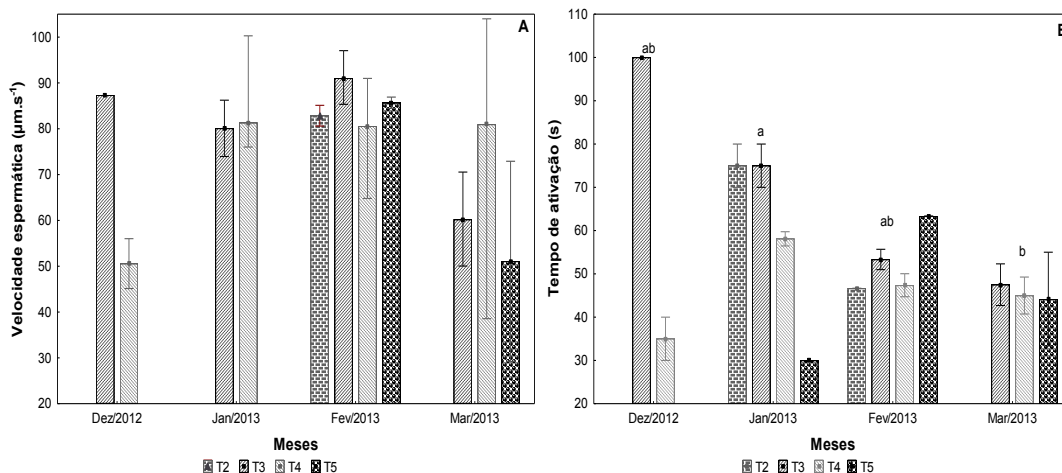


Figura 6. A) Velocidade espermática e B) tempo total de ativação do sêmen de *P. britskii*, submetidos à Etapa1 durante o experimento. [Tratamentos: T2) dose única 3 mg.kg^{-1} EHC; T3) dose prévia $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC, 2ª dose 3 mg.kg^{-1} ; T4) dose prévia $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ EHC 2ª dose 7 mg.kg^{-1} ; T5) dose única $200 \text{ UI hCG.kg}^{-1}$].

Os valores médios da normalidade espermática foram significativamente diferentes somente nos meses de dezembro/2012 e fevereiro/2013. A normalidade espermática, assim como, a concentração espermática, motilidade e o tempo total de ativação foram superiores no início do período reprodutivo e diminuíram gradativamente ao longo do mesmo. Em março/2013 houve uma nova ascensão nos valores de normalidade espermática, exceto para o sêmen de peixes induzidos com hCG (T5). Não houve diferença significativa na relação entre os meses e tratamentos ($p > 0,05$).

8 Discussão

Uma das maiores preocupações para programas de reprodução no setor produtivo é a dificuldade na obtenção de sêmen de algumas espécies de peixes Siluriformes. Uma revisão realizada por Viveiros e Godinho [35] afirma que a dose hormonal aplicada em peixes brasileiros de água doce atua no sentido de aumentar o volume seminal. Em *P. britskii*, durante o período de dezembro/2012 a março/2013, a liberação de sêmen foi possível a partir da indução hormonal e massagem abdominal, porém, em quantidades máximas de 0,1 mL, onde o T4 (EHC) foi o mais eficiente, pois, um maior número de peixes liberou sêmen, apresentando variáveis seminais satisfatórias. Viveiros et al [36] afirmam que o extrato de hipófise (em dose dupla ou única) é utilizado mundialmente, para induzir a desova, ou ainda combinado com outros hormônios. Estes hormônios possuem altos níveis de LH, que agem diretamente nas gônadas e induzem à espermição ou maturação ovocitária [2]. O LH é envolvido principalmente na estimulação de produção de androgênio nas células de Leydig, é muito baixo durante o início da espermatogênese mas aumenta durante o crescimento testicular e desova [37].

Para o *P. britskii* foi evidenciado que o volume seminal está diretamente ligado à indução hormonal e ao período reprodutivo, no qual constatou-se que a partir de janeiro/2013 o volume seminal diminuiu, porém, em fevereiro/2013 um maior número de exemplares respondeu positivamente aos tratamentos hormonais. Quando os peixes foram induzidos o volume de sêmen produzido aumentou em comparação ao tratamento sem indução (controle). O mesmo foi observado para *Barbus barbus*, segundo Alavi et al [38], Cejko et al [39] e Cejko et al [40] o volume de sêmen, a produção espermática e a motilidade

alteram significativamente durante o ciclo reprodutivo, e também com do tempo após o tratamento hormonal.

Em *P. britskii*, a coleta de sêmen após a indução hormonal foi possível, porém, em pequeno volume (0,1mL) e menores concentrações nos meses de fevereiro e março, quando comparado ao sêmen dos testículos macerados (0,49mL). Provavelmente, os valores de menor concentração espermática de *P. britskii* estejam relacionados com a liberação apenas do sêmen presente na região caudal dos testículos, que é semelhante aos testículos do *Pimelodus maculatus* [41] e possui atividade secretora, enquanto as franjas da região cranial possuem função espermatogênica.

Como alternativa para obtenção de um maior volume de sêmen de *P. britskii* optou-se por medidas extremas, mesmo com a aplicação de EHC, houve a necessidade da remoção e maceração dos testículos, esta prática já havia sido utilizada para *Clarias gariepinus* por Rurangwa et al [6] e Viveiros et al., [7]. Segundo Shibatta et al [9] o problema não está na dosagem hormonal, mas sim na morfologia dos testículos de algumas espécies de Siluriformes, como *Sorubim lima*, *Zungaro jahu* [10], *Pseudoplatystoma fasciatum* [19] e *Pimelodus maculatus* [11], cujo formato é digitiforme e não tubular. Esta característica impede que o sêmen seja liberado das franjas, insida para os túbulos seminíferos e então, seja liberado através de massagem abdominal.

Alavi e Cosson [42] afirmam que o pH influencia na motilidade espermática, porém, esse resultado não foi verificado para o sêmen de *P. britskii*. No presente estudo o pH seminal de *P. britskii* apresentou média de 6,0 para peixes macerados/induzidos e 7,0 para os demais tratamentos, contudo,

não foi constatada nenhuma influência dos valores de pH nos resultados de velocidade, motilidade e tempo total de ativação.

Parece existir uma relação entre a coloração do sêmen e concentração espermática, sendo que quanto mais esbranquiçado-cremoso maior a concentração para o gênero *Steindachneridion* [43,29]. Os *P. britskii* que tiveram os testículos macerados apresentaram maiores valores de concentração espermática ao longo do ciclo reprodutivo, apresentando a coloração do sêmen esbranquiçada-cremosa diferindo do sêmen obtido por meio da massagem da região abdominal, translúcido-aquoso. Nogueira et al [10] encontraram o sêmen do jaú, *Zungaro jahu* diluído após a indução hormonal e testículos macerados cujos valores de concentração do sêmen massageado foi $12,6 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ e do sêmen proveniente dos testículos macerados foi $62,7 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$. A indução hormonal no *P. britskii* promoveu maior produção de fluido seminal, verificado através do volume, e também a maior produção de células espermáticas verificada na concentração, este

Logo, os valores de motilidade e velocidade espermática do *P. britskii* diminuíram imediatamente após 10 segundos de ativação, resultados semelhantes a *Rhamdia quelen* e *Steindachneridion parahybae* [44,29]. O mesmo foi constatado para *Clarias gariepinus* [45], porém, a duração da motilidade foi de apenas 30 segundos, valor inferior quando comparado com os de *P. britskii*. Em *Rhamdia quelen* [46] os machos induzidos apresentaram motilidade superior (88,3%) aos não-induzidos, o tempo de motilidade para *Steindachneridion scripta* variou de 46 a 75 segundos [43]. Nogueira et al [10] encontraram no sêmen dos testículos macerados do *Zungaro jahu* a motilidade espermática superior à 90%.

A motilidade espermática do *P. britskii* é em média 90% para os peixes induzidos e que receberam massagem abdominal e, inferior a 63 % para peixes com os testículos macerados. Essas taxas diminuíram gradativamente durante o período reprodutivo, provavelmente, devido ao choque mecânico do processo de maceração, resultando na presença de um grande número de espermatozoides com defeitos leves (cabeça e cauda soltas, cauda torta), afetando diretamente nos valores de motilidade e velocidade espermática, corroborando com os de Maria et al [44] que verificaram que o sêmen de *Colossoma macropomum* não-induzidos apresentou valores de normalidade inferiores aos induzidos, e foi encontrado um número elevado de espermatozoides com cabeça solta.

A velocidade espermática está diretamente ligada à capacidade de fertilização [49]. Para o sêmen de *P. britskii* os valores de velocidade foram superiores para o sêmen de peixes induzidos com EHC, e também, apresentou redução ao final do ciclo reprodutivo (março/2013). Os espermatozoides provenientes dos testículos macerados apresentaram velocidades inferiores, porém, sem influência do ciclo reprodutivo. E assim como em *Steindachneridion parahybae* [5], os valores de velocidade diminuíram drasticamente após 10 segundos de ativação. Cosson [48] menciona que os valores de alta velocidade inicial dos espermatozoides resultam na curta duração da motilidade, pois, as células espermáticas apresentam um estoque limitado de energia. Segundo Perchee et al [50] o tempo de duração da motilidade espermática também é influenciado por danos à membrana causada pelo estresse osmótico enquanto, as mudanças nos valores da velocidade podem ter relação com o comprimento flagelar [38].

O tempo total de ativação dos espermatozoides de *P. britskii* também foi influenciado pelo período reprodutivo e indução hormonal, verificando-se que os peixes que receberam hormônio apresentaram maior tempo de ativação. Para o Etapa 1 o tempo de ativação dos espermatozóides foi inferior e, provavelmente, isso tenha ocorrido pela possível contaminação do sêmen com urina. Logo, a curta duração da motilidade desses espermatozoides em água doce (neste estudo) possa ser devido à rápida deterioração dos espermatozoides [51]. Possivelmente, isto ocorra, devido aos choques osmóticos, pH, temperatura do meio diluidor no momento em que o sêmen é ativado de acordo com Alavi e Cosson [42]. Sanches et al [5] supõe que a água destilada também, é extremamente prejudicial à membrana do espermatozoide e, atua diretamente na deterioração da membrana. Notou-se que *P. britskii* induzidos com hCG tiveram tempo total de motilidade inferior aos induzidos com EHC.

A qualidade espermática de *P. britskii* submetidos ao tratamento com hCG foi satisfatória e, em alguns casos foram similares aos tratados com EHC. O hCG estimou a espermição de *Odontesthes bonariensis* [52] e influenciou o aumento do volume seminal e concentração espermática para enguias [53], ambas as espécies apresentam limitação na espermição. Targońska e Kucharczyk [54] explicam que utilizando-se o hCG a produção de gametas é menor, mas que a qualidade biológica foi superior, porém, as características seminais (motilidade e concentração) são normalmente inferiores. Cacot et al [55] e Pan et al [56] trabalhando com Siluriformes advertem que o indutor, hCG apresentou resultados satisfatórios na produção espermática, porém, as doses utilizadas foram mais altas, sugerindo que deve-se testar diferentes doses

(2000 UI), sugerindo que deva-se testar essa dosagem com *P. britskii*. A efetividade de uma única dose de hCG pode ser devido a longa permanência deste hormônio na corrente sanguínea [57] pelo fato de apresentar maior resistência a degradação que outras proteínas [37]. Outra vantagem do hCG é a sua ação direta nas gônadas, sem que haja necessidade de estoques de LH [58].

A influência do período reprodutivo sobre a maturação e desenvolvimento testicular do *P. britskii* pode ser confirmada a partir dos valores do IGS, com atividade máxima em novembro-dezembro/2012 e, em seguida, verifica-se a diminuição do índice ao longo dos meses, corroborando com resultados encontrados em *Pseudoplatystoma fasciatum* [59].

Pode-se observar que a qualidade de sêmen do *P. britskii*, tanto para animais induzidos quanto os não-induzidos, apresentou uma melhora satisfatória na qualidade seminal durante a realização do experimento, embora no decorrer do período reprodutivo verificou-se um decréscimo nos valores das variáveis espermáticas e do IGS. Porém, apesar do aumento do IGS após a indução hormonal pode-se considerar o *P. britskii* como oligoespermico (IGS ≤ 1%), esta característica, bem como a pequena liberação de sêmen, muitas vezes insuficientes para avaliação espermática, são encontradas para diversas espécies de Siluriformes [60].

Estudos que avaliem os mecanismos e a morfologia reprodutiva do *P. britskii* e de outras espécies que apresentam dificuldade durante a reprodução artificial são necessários para que

9 Conclusão

O período reprodutivo influenciou a produção e qualidade espermática do *P. britskii*. Apesar do pouco volume seminal liberado, a dose 7,5 mg.kg⁻¹ de EHC mostrou-se eficaz. O período reprodutivo e a indução hormonal influenciaram a concentração espermática, porém, a motilidade e velocidade se mantiveram estáveis durante o período estudado.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado (processo nº2012/17789-3). A Tractebel Energia pelo fornecimento dos peixes utilizados no experimento. Ao LATRAAC e a UNIOESTE pela estrutura e apoio logístico. Aos graduandos *Rogério A. Druzian, Yuri Contrera e Jackson Pablo*. Aos mestrandos: *Alexandre H. Buzzi, Ricardo A. Krause, Andressa Dean, Adriano, Giovano Neumann, Cesar P.R de Toledo, Cintia N. Burato, Vitor Sendin*. Aos doutorandos: *Cleonice Hilbig e Lucélia Tessaro*.

Documentação fotográfica



Figura 7. Machos de *P. britskii*. A) Seleção de machos no tanque; B) Pesagem em laboratório; C) Marcação e leitura dos TAG's; D) Indução hormonal; E) Anestesia com solução de benzocaína; F) Coleta de sêmen por meio de massagem abdominal.

Documentação fotográfica



Figura 8. A) Testículos de *P. britskii* eutanasiado para retirada dos testículos; B) Pesagem dos testículos em balança analítica; C) Corte dos testículos; D) Maceração dos testículos e coleta de sêmen; E) Análises espermáticas no software livre CASA; F) Análise espermática em microscópio (concentração e morfologia espermática).

10 Referências bibliográficas

[1] Cejko BI, Krejszeff S, Judycka S, Sarosiek B, Dietrich M, Kucharczyk D, Kowalski RK. Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquacult International* 2014; 22:111–122.

[2] Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 2010; 165: 516–534.

[3] Romagosa E. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *Journal Applied of Ichthyology* 2010; 26: 806–811.

[4] Bombardelli RA, Mörschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA, Sypereck MA. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2006; 35: 1251-1257.

[5] Sanches EA, Marcos RM, Okawara RY, Caneppele D, Bombardelli RA, Romagosa E. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal Applied of Ichthyology* 2013; 29: 1114–1122.

[6] Rurangwa E, Volckaert FAM, Huyskens G, Kime DE, Ollevier F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). *Thenogenology* 2000; 55: 751-769.

[7] Viveiros ATM, Fessehayey, ter Veld M, Schulz RW, Komen J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 2002; 213: 373–386.

[8] Gima ME, Gima A, Hutson A, Chaimongkol A, Beam R, Perera DA, Dunham RA. Realized heritability and response to selection for fecundity,

hatching rate and fry/Kg for channel catfish females (*Ictalurus punctatus*) induced to ovulate and fertilized with blue catfish (*Ictalurus furcatus*) males for the production of hybrid catfish embryos. *Aquaculture* 2013; 24–30.

[9] Shibatta OA, Novelli JL, Dias JHP, Britto SGC, Filho MC.. Reprodução em cativeiro do jurupê *Sorubim lima* (Siluriformes, Pimelodidae) por meio de indução hormonal. *Semina: Ciências Agrárias* 2011; 32(1): 363-372.

[10] Nogueira LB, Azevedo PG, Canelhas MR, Bedore AG, Lopes JM, Godinho HP. Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* 2012; 10(1): 89-98.

[11] Sato Y, Fenerich-Verani N, Verani JR, Godinho H P, Sampaio EV. Reproductive traits of the yellow-mandi catfish *Pimelodus maculatus* Lacepede (Osteichthyes, Siluriformes) in captive breeding. *Revista Brasileira de Zoologia* 1999; 16 (4): 981 – 986.

[12] Cabrita E, Robles V, Harráez P. Sperm quality assessment. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P, editors. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*, New York: Taylor & Francis Groups; 2008, p. 93-147.

[13] Scorvo Filho JD. Piscicultura em tanques-rede uma alternativa para grandes e pequenos corpos d'água. In: *AveSui América Latina*, Florianópolis Brasil. 2008.

[14] Romagosa, E. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. (Eds). *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. São Paulo: Jaboticabal, v. único, capítulo 3, 2006, p. 107-116.

[15] Guerrero H Y, Cardillo E, Poleo G, Marcano D. Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. *Fish Physiology Biochemical* 2009; 35:189–196.

[16] Loir M, Cauty C, Planquette P, Le Bail PY. Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. *Aquatic Living Resourch* 1989; 2: 45-56.

[17] Melo RMC, Arantes FP, Sato Y, Santos JE dos, Rizzo E, Bazzoli N. Comparative Morphology of the Gonadal Structure Related to Reproductive Strategies in Six Species of Neotropical Catfishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Morphology* 2011; 272: 525–535.

[18] Santos JE, Bazzoli N, Rizzo E, Santos GB. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lu Ètken, 1874) (Siluriformes:Pimelodidae). *Tissue & Cell* 2001; 33(5): 533- 540.

[19] Batlouni SR, Carreño FR, Romagosa E, Borella MI. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *Pseudoplatystoma fasciatum*(Pisces, Siluriformes). *Journal of Molecular Hystology* 2005; 36: 97–110.

[20] Romagosa, E. Avanços na reprodução de peixes migradores. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati E.C. (Eds.) *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, SP, 2008. p. 1-16.

[21] Garavello JC, Shibatta OA. A new species of the genus *Pimelodus* (LA CÉPÈDE, 1803) from do rio Iguaçu basin and a reappraisal of (*Pimelodus ortmani*) (Haseman, 1911) from de rio Paraná system, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* 2007; 5 (3): 282-292.

[22] Zaniboni-Filho E, Nuñez APO. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli N, (Eds.) *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*, São Paulo: TecArt; 2004, 533 p.

[23] Sato Y, Fenerich-Verani N, Godinho HP. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho HP, Godinho AL, editors. *Água*,

peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Belo Horizonte: Editora PUCMinas; 2003, p.275-289.

[24] Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), 2008. Resolução nº 876, de 15-02-2008, publicada no DOU de 25-02-2008. Seção 1, p. 100.

[25] Asturiano JF, Sorbera LA, Carrilo M, Zanuy S, Ramos J, Navarro JC, Bromage N. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA—enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* 2001; 194: 173–190

[26] Leonardo AFG, Romagosa E, Borella MI, Batlouni SR. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture* 2004; 240: 451–461.

[27] Sanches EA, Bombardelli RA, Baggio DM, Sykora RM, Xavier AMM,. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2011; 35(3): 357-362.

[28] Poupard GP, Paxion C, Cosson J. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture* 1998; 160: 317-328.

[29] Caneppele, D. *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) (Siluriformes: Pimelodidae): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca. 2011. 70p.

[30] Wirtz S, Steinmann P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology* 2006; 68: 1896-1902.

[31] Tessaro L, Toledo CPR, Neumann G, Krause RA, Meurer F, Natali MRM, Bombardelli RA. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture* 2012; 326-329: 74–80.

[32] Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 2007, 67: 661–672.

[34] Colégio Brasileiro De Reprodução Animal (CBRA), 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, second Ed. CBRA, Belo Horizonte.

[35] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 2009; 35: 137-150.

[36] Viveiros ATM, Gonçalves ACS, Di Chiacchio IM, Nascimento AF, Romagosa E, Leal MC. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRH α and dopamine antagonist treatment. *Zygote* 2013; 1-10.

[37] Mañanos E, Duncan N, Mylonas CC. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: Cabrita E, Robles V, Herráez MP. (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2008; 3–80.

[38] Alavi SMH, Psenicka M, Rodina M, Policar T, Linhart O. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquatic Living Resour.* 2008; 21. 75–80.

[39] Cejko BI, Kowalski RK, Zarski D, Dryl K, Targonska K, Chwaluczyk R, Kucharczyk D, Glogowski J. The influence of the length of time after hormonal treatment with [(D-Ala⁶, Pro⁹NEt)-mGnRH metoclopramide] i.e. Ovopel on barbel *Barbus barbus* (L.) milt quality and quantity indicators. *Journal Applied of Ichthyology* 2012; 28:249–253.

[40] Cejko BI, Zarski D, Judycka S, Kucharczyk D, Sarosiek B, Kowalski RK. Effect of two commercial preparations containing different GnRH analogues

with dopamine antagonists on barbel *Barbus barbus*(L.) sperm quantity and quality. *Aquacult Int.* 2013.

[41] Arantes FP, Borçato FL, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N. Reproduction and embryogenesis of the mandi-amarelo catfish, (Pisces, Pimelodidae), in captivity. *Anatomia Histologia Embryologia* 2013; 42: 30–39.

[42] Alavi SMH, Cosson JJ. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 2005; 29: 101-110.

[43] Luz RK, Ferreira AA, Reynalte DAT, Zaniboni-Filho E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca* 2001; 27 (1): 39 – 42.

[44] Sanches EA, Bombardelli RA, Marcos RM, Neumann G, Toledo CPR, Romagosa E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* 2010; 42: 153-156.

[45] Mansour N, Ramoun A, Lahnsteiner F. Quality of testicular semen of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with fertilization and hatching success. *Aquaculture Research* 2005; 36:1422-1428.

[46] Ferreira AA, Nuñez APO, Luz RK, Tataje DAR, Esquivel JR, Restrepo J B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*. *Boletim do Instituto de Pesca* 2001; 27 (1): 57 – 60.

[47] Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 2011; 20: 39–43.

[48] Cosson J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology* 2010; 76: 240 – 279.

[49] Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 2004; 234: 1-28.

[50] Perche G, Jeulin C, Cosson J, André F, Billard F. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* 1995; 108: 747-753.

[51] Perche G, Cosson MP, Cosson J, Jeulin C, Billard R. Morphological and kinetic sperm changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1996; 35: 113 – 120.

[52] Miranda LA, Cassará MC, Somoza GM. Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835). *Aquaculture Research*, 2005; 36: 1473-1479.

[53] Asturiano F, Marco-Jiménez F, Pérez L, Balasch S, Garzón DL, Peñaranda DS, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, Jover M. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* 2006; 66: 1012–102

[54] Targońska e Kucharczyk, 2011. The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. *Reprod Dom Anim* 46, 651–655.

[55] Cacot P, Eeckhoutte P, Muon DT, Trieu NV, Legendre M, Mariojouis C, Lazard J. Induced spermiation and milt management in *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880). *Aquaculture* 2003; 215: 67–77.

[56] Pan J, Ding S, Ge J, Yan W, Hao C, Chen J, Huang Y. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture* 2008; 279: 173–176.

[57] Ohta H, Tanaka H. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 1997; 153, 123–134.

[58] Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 2001; 197, 99–136.

[59] Batlouni SR, Romagosa E, Borella MI. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* 2006; 96: 116–132.

[60] Legendre M, Linhart O, Billard R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Living Research* 1996; 9:59-80.

11 Anexo 1 – Paracer do Comitê de Ética Animal da UNIOESTE.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUACAO

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

RUA UNIVERSITÁRIA, 2069 – PREDIO DA BIBLIOTECA – CAMPUS DE CASCAVEL - JD. UNIVERISTÁRIO

FONE: (45) 3220-3272 E 3277 - CEP 85619-110 - CASCAVEL – PR



Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/UNIOESTE

PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO

PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL: 03112

TÍTULO DO PROJETO: Tecnologia para formação de bancos de germoplasma e produção de peixes nativos para estocagem no rio Iguaçu

SOLICITANTE: Robie Allan Bombardelli

O projeto acima foi **aprovado**, conforme Ata 06-2012 em reunião ocorrida em 14/08/2012 realizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, desde que seguido o protocolo proposto e avaliado por este Comitê.

Lembramos que, de acordo com as atribuições, o CEUA se resguarda do direito de realizar visitas aos locais onde os projetos serão executados com finalidade de acompanhamento.

Ao término da vigência do projeto e apresentação do relatório final, o coordenador receberá um certificado de que o protocolo realizado seguiu os princípios da experimentação animal, de acordo com sua respectiva ata de aprovação em data especificada.

Cascavel, 14 de agosto de 2012.

Prof. Dr^a Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora CEUA/UNIOESTE
Processo nº 2861/2012-GRE