

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

IBB- INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

LAICIA CARNEIRO LEITE

Inclusão de óleo de peixe marinho na dieta de reprodutor de
Astyanax lacustris (Lutken 1875): desempenho, qualidade
seminal e criopreservação do sêmen.

Botucatu – SP

2023

LAICIA CARNEIRO LEITE

Inclusão de óleo de peixe marinho na dieta de reprodutor de *Astyanax lacustris* (Lutken 1875): desempenho, qualidade seminal e criopreservação do sêmen.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Instituto de Biociências, UNESP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Hellen Buzollo Pazzini

Botucatu – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Leite, Laícia Carneiro.

Inclusão de óleo de peixe marinho na dieta de reprodutor de *Astyanax lacustris* (Lutken 1875) : desempenho, qualidade seminal e criopreservação do sêmen / Laícia Carneiro Leite. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

Coorientador: Hellen Buzollo Pazzini

Capes: 20406002

1. Reprodução. 2. Ácidos Graxos Insaturados. 3. Peixe de água doce. 4. Congelamento. 5. Peixes - reprodução. 6. Criopreservação.

Palavras-chave: Ácidos graxos poli-insaturados; Congelação; Espermatozoides de peixes; Lambari-do-rabo-amarelo; Reprodução.

Dedico este trabalho aos meus pais: Assunção Douro Leite e a Maria Lima Carneiro (in memoriam) pelo apoio e amor incondicional. A cada um dos meus irmãos e sobrinhos pelo amor, apoio e ajuda. A vocês, dedico todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por meu suporte e amparo em todos os momentos, em especial naqueles em que não pude compartilhar minhas dores e tristezas e por me mostrar todos os dias o quanto me ama, OBRIGADA.

A minha mãe Maria Lima Carneiro (in memoriam) que foi e sempre será minha principal força, você me deixou muito cedo, mas saiba que tudo isso era por você e continua sendo, porque foi você que não me deixou desistir, foi você a pessoa que mais me incentivou e deu forças para eu continuar essa trajetória. Eu tinha certeza que não conseguiria, mas mais uma vez você mesmo não estando aqui me deu forças para continuar, e todas as vezes que parei e pedir luz e forças para você eu recebi e lhe agradeço tanto por isso, se estou hoje concluindo esta etapa é por você. Obrigada pela mulher e mãe que você foi, você é meu exemplo de mulher e mãe, obrigada por cada dificuldade que você passou por nós, obrigada por cada palavra, abraço, beijo, obrigada por me incentivar e cuidar de mim sempre, obrigada por me priorizar durante toda a sua a vida. “Te amarei de janeiro a janeiro, até o mundo acabar”. EU TE AMO INFINITAMENTE, OBRIGADA.

Ao meu pai Assunção Douro Leite, por ser minha base, por me dar forças, por ser meu exemplo de homem, por ser esse pai maravilhoso, por me apoiar incondicionalmente, por demonstrar em cada conversa o quanto tem orgulho da sua filha. Obrigada por acreditar sempre em mim TE AMO INFINITAMENTE.

Aos meus irmãos Claudia, Valdineia, Audileia, Diego, Lineia e Deilane, por me apoiaram e me motivarem sempre, vocês são os melhores irmãos do mundo. Obrigada por cada palavra de consolo e incentivo, por suportar tudo comigo, por fazer do meu sonho o de vocês também e compreender o porquê de eu estar longe em todos os momentos de alegrias e tristezas também, simplesmente obrigada por me amarem e demonstrarem isso todos os dias. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

Aos meus cunhados Fernando, Nonato e Mauro obrigado por cuidarem das minhas joias preciosas sempre. A minha cunhadinha Antonia por cuidar do meu irmão e por ser muito mais que uma cunhada, uma irmã. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

Aos meus sobrinhos Arthur, Guilherme, André, Valentina, Isis, Lorenzo e Livia Maria, Benjamin e Liz Vitória vocês são minha motivação diária, tudo o que faço é por vocês e para vocês. Obrigada por todos os sorrisos, por todas as alegrias, por todo carinho, vocês são a dose diária de amor e carinho. É com vocês que

recarrego minhas energias. Com vocês descobrir o melhor abraço, o melhor beijo, o melhor sorriso. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

A Lorena Frigini pela amizade e companheirismo, você é especial demais para mim. Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos deste o primeiro dia que nos conhecemos. Obrigada por cada palavra, abraço, sorriso, ligação, por deixar o seu sofrimento de lado para cuidar do meu. EU TE AMO TANTO, OBRIGADA.

Aos todos os meus amigos de Chapadinha-MA que mesmo com a distância me apoiaram e me deram forças sempre, em especial as minhas Andressa Douro e Vanna Diniz que estão comigo pra tudo sempre, que em um único minuto de conversa conseguem tirar a minha melhor versão, eu sou muito grata por ter vocês na minha vida, amo vocês OBRIGADA

A Luciane, Khatarine e Valdomiro por estarem comigo sempre em Ilha Solteira, por serem meu apoio fora da Universidade, por cada momento juntos que aliviaram a minha tristeza e meu estresse, vocês são presente de Deus. EU AMO VOCÊS, OBRIGADA.

A Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho - UNESP, por me acolher desde o mestrado e me possibilitar realizar esse sonho, minha eterna gratidão, OBRIGADA.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 434283/2018-5) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto (Processo Fapesp 2020/15020-0).

Ao meu orientador, Alexandre Ninhaus Silveira pela oportunidade, por ter aceitado me orientar desde o mestrado sem ao menos me conhecer pessoalmente, você abriu as portas do L.I.Neo e com isso tornou possível a realização desse sonho. Obrigada por todo apoio, conversas, ensinamentos, críticas (construtivas claro), pela paciência, atenção, compreensão, incentivo, por acreditar sempre no meu potencial, serei eternamente grata, OBRIGADA.

A minha coorientadora Hellen Buzollo Pazzini por todo apoio, ajuda, paciência, atenção e compreensão, por estar sempre disponível, por sanar todas as minhas dúvidas, só tenho a agradecer a você, OBRIGADA.

Ao Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.Neo) e cada integrante desse grande laboratório que me ajudaram direto ou indiretamente. Obrigada pelas conversas, coletas, apoio, risadas, estudos, nós somos como uma grande família em que todos se ajudam pelo bem de cada um e do laboratório em geral especial Bárbara Bianchini, Luana, Viviane, Giovana, Jéssica, Mayara, Yasmim, Lorena, Stella, Lais e Luciane você tornam minha vida de pós-graduanda mais leve. A Profa. Dra. Rosicleire Verrissimo Silveira por toda ajuda e apoio sempre, OBRIGADA.

A Stella, Lais, Lorena Pacheco e Luciane que merecem sem dúvida nenhuma um parágrafo destes agradecimentos porque me ajudaram desde início e durante toda a execução do meu projeto, vocês nunca me deixaram sozinha, e eu serei eternamente grata, OBRIGADA.

Aos todos funcionários da UNESP/ Ilha Solteira por serem tão atenciosos desde os guardas, galera da limpeza, os técnicos dos laboratórios em especial ao Sidival do Laboratório de Bromatologia pelo auxílio nas análises, ao Laboratório de Estudos de Fisiologia Animal, UNESP, Campus Ilha Solteira e Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, USP/ Campus São Paulo no nome da professora Cristiele Ribeiro pelo auxílio e ajudas nas análises.

As professoras Mônica Machado e Jaqueline Biller por terem participado da minha banca de qualificação agradeço por cada apontamento e contribuição, OBRIGADA.

Aos professores Carminda Salmito-Vanderley, Taís Lopes, Rosemeire Filardi, Leandro Godoy, Giovana Branco, Alan Melo e Robie Bombardelli por terem aceito participar da minha banca de defesa de doutorado, desde de já agradeço por cada apontamento e contribuição, OBRIGADA.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da inclusão de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PUFAs-ô3) na dieta de machos de *Astyanax lacustris* sobre o desempenho, a qualidade seminal e a resistência dos espermatozoides à baixa temperatura. Para tal, 400 machos foram dispostos em 20 caixas de 180 L e alimentados durante 105 dias com dietas isoproteicas (32% PB) contendo 0, 3, 6 e 9% de inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) rico em PUFAs-ô3. Foram avaliados os parâmetros de desempenho zootécnico, a qualidade seminal e a crioresistência dos espermatozoides ao processo de congelação e descongelação. Para os parâmetros de desempenho não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de inclusão de óleo marinho. Entretanto, foi observado uma alteração do perfil de ácidos graxos nos músculos, com o aumento da quantidade de DHA no tratamento com 3% de OPM e EPA no tratamento com 6% de OPM. A inclusão de PUFAs-ô3 na dieta de *A. lacustris* influenciou positivamente os parâmetros cinéticos espermáticos, sendo que os níveis com 6 e 9% de OPM proporcionaram valores significativamente maiores para a maioria dos parâmetros analisados. Após análise dos resultados pode-se concluir que, a adição PUFAs-ô3 na alimentação de reprodutores melhorou a qualidade do músculo e, aumentou significativamente a qualidade seminal dos machos de *A. lacustris*, melhorando as os parâmetros cinéticos dos espermatozoides. Entretanto, para o sêmen criopreservado, apesar de não influenciar nas características cinéticas dos espermatozoides pós descongelação, manteve a capacidade de fertilização dos gametas com uma leve indicação para o tratamento com 6% de OPM e para o uso da solução crioprotetora 1.

Palavras-chave: reprodução; ácidos graxos poli-insaturados; lambari-do-rabo-amarelo; espermatozoides de peixes; congelação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of including omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs- ω 3) in the diet of *Astyanax lacustris* males, on productive performance, seminal quality and sperm resistance to low temperatures. To this end, 400 males were placed in 20 boxes of 180 L and fed for 105 days with isoprotein diets (32% CP) containing 0, 3, 6 and 9% inclusion of marine fish oil (OPM) rich in PUFAs- ω 3. Zootechnical performance parameters, seminal quality and sperm cryoresistance to the freezing and thawing process were evaluated. For performance parameters, no significant differences were observed between marine oil inclusion levels. However, a change in the profile of fatty acids in the muscles was observed, with an increase in the amount of DHA in the treatment with 3% OPM and EPA in the treatment with 6% OPM. The inclusion of PUFAs- ω 3 in the diet of *A. lacustris* positively influenced sperm kinetic parameters, with levels with 6 and 9% of OPM provided significantly higher values for most of the analyzed parameters. After analyzing the results, it can be concluded that the addition of PUFAs- ω 3 in the feeding of breeding animals improved the quality of the muscle and significantly increased the seminal quality of the *A. lacustris* males, improving sperm kinetic parameters. However, for cryopreserved semen, despite not influencing the kinetic characteristics of spermatozoa after thawing, it maintained the fertilization capacity of gametes with a slight indication for treatment with 6% OPM and the use of cryoprotectant solution 1.

Keywords: reproduction; polyunsaturated fatty acids; yellowtail lambari; fish sperm; freezing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1. Lipídios na nutrição de peixes	12
2.1.1. Ácidos graxos	13
2.1.2. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) no desempenho produtivo de peixes.....	15
2.1.3. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na reprodução de peixes.....	16
2.1.4. Ácidos graxos e a criopreservação.....	17
2.2. <i>Astyanax lacustris</i> (Lambari-do-rabo-amarelo)	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
4. CAPÍTULO I.....	32
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
5. CAPÍTULO II.....	65
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS	71
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
6. CAPÍTULO III.....	92
INTRODUÇÃO.....	95
MATERIAL E MÉTODOS	99
RESULTADOS	107
DISCUSSÃO	120
CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura cresceu substancialmente nas últimas décadas, alcançando um novo recorde de produção em 2020 de 122,6 milhões de toneladas de peso vivo (FAO, 2022). No Brasil, a aquicultura teve uma produção de 860,355 toneladas em 2022, um crescimento de 2,3% em relação a 2021 (PEIXE BR, 2023).

O lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax lacustris* é uma espécie nativa, de pequeno porte, que é produzida no Brasil principalmente devido ao mercado de iscas vivas e também para o consumo humano. Em 2021 foram produzidos 599,380 quilogramas de lambari, sendo a região Sudeste a maior produtora (271,101 kg), com destaque para São Paulo como maior produtor de lambari (167,130 kg) (IBGE, 2021).

O sucesso da criação em cativeiro depende, dentre outros fatores, de uma nutrição adequada, que atenda as exigências para a espécie, evitando danos à saúde animal, reduzindo o estresse e ocasionando um crescimento saudável e maior eficiência alimentar (Oliva-Teles 2012). Além disso, a nutrição influencia no sucesso reprodutivo da espécie (Lall; Tibbetts, 2009).

A adequada nutrição de peixes requer que a dieta forneça proteínas, carboidratos, lipídeos, vitamina e minerais. Entre os lipídeos destaca-se a importância dos ácidos graxos, em especial os poli-insaturados (PUFAs), pois participam dos processos de síntese de hormônios eicosanoides, organogênese e estrutura e composição de membranas (Kottmann *et al.*, 2020; Lall; Tibbetts, 2009).

Os PUFAs atuam na reprodução nos processos de gonadogênese, ovulação, fertilidade, desova, incubação de ovos, embriogênese, composição e qualidade das larvas, fatores esses importantes para o sucesso reprodutivos na piscicultura (Asil *et al.*, 2017; Agh *et al.*, 2019; Hilbig *et al.*, 2019). Os PUFAs proporcionam ainda uma maior resistência e aumentam a viabilidade dos espermatozoides de peixes, principalmente por atuarem na estrutura, composição e fluidez das membranas dos espermatozoides, fatores fundamentais para criopreservação de sêmen, técnica que permite a conservação de material genético por tempo indeterminado (Lahnsteiner *et al.*, 2009; Carvalho, 2012; Horokhovatskyi *et al.*, 2016; Díaz *et al.*, 2018). Isto ocorre porque os PUFAs são componentes de fosfolipídios das biomembranas dos peixes incluindo a dos espermatozoides, e o teor de PUFAs da dieta pode alterar a composição lipídica da membrana dos espermatozoides, aumentando assim a sua

fluidez devido ao aumento de PUFA's na membrana. Além disso, os PUFA's alteram a temperatura na transição entre os estágios líquido e cristalino, diminuindo a formação de cristais de gelo, e conseqüentemente aumentando a resistência ao processo de congelamento e descongelamento (Izquierdo *et al.*, 2001; Lahnsteiner *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2017; Díaz *et al.*, 2021)

Como os peixes não são capazes de sintetizar esses PUFA's, é necessário a inclusão dos mesmos na dieta. Portanto torna-se evidente a importância de estudos para avaliar os efeitos dos PUFA's sobre o desempenho zootécnico de peixes e eficiência na criopreservação de sêmen.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipídios na nutrição de peixes

A nutrição de peixes avançou significativamente nos últimos anos, com o estabelecimento de dietas para diferentes espécies, o que proporciona bom desempenho zootécnico e saúde (Craig; Kuhn; Schwarz, 2017). Isto porque a nutrição juntamente com o manejo alimentar tem influência direta no crescimento, reprodução, saúde, resposta a estressores e patógenos fisiológicos e ambientais (Lall; Tibbetts, 2009).

Como os demais animais, os peixes necessitam de lipídios, aminoácidos, fibras, hidrato de carbonos, vitaminas e minerais, nutrientes cuja as quantidades são fornecidas na dieta e de acordo com a espécie, idade, funções produtivas e condições ambientais (Santos *et al.*, 2014). Dentre estes nutrientes, o lipídio tem grande importância por influenciarem no crescimento e desenvolvimento dos peixes (Qin *et al.*, 2022).

Lipídio é a palavra utilizada para definir um grupo de substâncias que têm como características a insolubilidade em água, mas é solúvel em solventes não polares tais como clorofórmio, álcoois e hidrocarbonetos (Gurr; James, 1980). Os lipídios incluem os triacilgliceróis, ésteres de cera, esteróis e fosfolipídios e tem como funções ser fonte de energia, participar de vias de sinalização, fornecer ácidos graxos essenciais, serem componentes estruturais das membranas celulares, precursores para síntese de outros produtos celulares, além de agir na regulação e controle de doenças (Sud, *et al.*, 2007; Turchini; Torstensen; Ng, 2009; Fahy *et al.*, 2011). Quanto a sua

classificação, os lipídios podem ser classificados de acordo com suas propriedades físicas em temperatura ambiente (gordura - sólidas; óleos - líquidos), polaridade (polares ou neutros), estrutura (simples, complexos ou derivados) ou sua essencialidade para os humanos (ácidos graxos essenciais ou não essenciais) (Akoh, 2017).

No entanto, essa definição não abrange todos os lipídios, por exemplo, os ácidos graxos com quatro carbonos em suas caudas alifáticas que se misturam à água, mas são insolúveis para solventes não polares (Akoh, 2017). O interesse no estudo destes compostos data do século XIX, quando Vogel em 1847 identificou o colesterol nas placas de ateroma (Barbosa *et al.*, 2007). Já no século XX em estudo com esquimós, Bang e Dyerbeg (1972) sugeriram pela primeira vez o efeito protetor dos ácidos graxos sobre as doenças cardiovasculares.

2.1.1. Ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos contendo uma cadeia de hidrocarbonetos com comprimento variável, e uma extremidade terminada em um grupo metil e outra extremidade com um grupo carboxila (Yaqoob; Calder, 2007; Tvrzicka *et al.*, 2011). Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com a presença e número de ligações duplas, pela quantidade de átomos de carbono, pela localização das ligações duplas e pela orientação da dupla ligação (Kalish; Fallon; Puder, 2012).

Ácidos graxos saturados (AGS) apresentam apenas ligações simples entre suas cadeias carbônicas, enquanto nos ácidos graxos insaturados (AGI) as cadeias carbônicas são unidas por duplas ligações. Em função do número de duplas ligações, os AGI são classificados em monoinsaturados ou poli-insaturados. Os ácidos graxos saturados (AGS) são divididos de acordo com o comprimento da sua cadeia de carbono em: cadeia curta (3-7 carbonos), os de cadeia média (8 a 13 carbonos em sua cadeia) e os de cadeia longa que possuem acima de 14 carbonos. Os AGI também podem ser classificados como cadeia curta (menor que 19 carbonos), cadeia longa (20-24 carbonos) e cadeia muito longa (maior que 25 carbonos) (Gurr; Harwood, 1991; Kalish; Fallon; Puder, 2012; Santos *et al.*, 2013).

Já os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são ainda divididos em três grupos/famílias de acordo com posição da última dupla ligação em relação ao grupo

metil terminal da sua cadeia carbônica em: ácidos graxos poli-insaturados da série n-3 (ω -3- ômega 3), n-6 (ω -6 - ômega 6) e n-9 (ω -9 -ômega 9) (Shaikh; Edidin, 2006). Os ω -3 são derivados do ácido -linolênico (ALA), os ω -6 derivados do ácido linoleico (LA) e ω -9 são derivados do ácido oleico (OA) (Kalish; Fallon; Puder, 2012).

Dentre os PUFAs, o ALA e o LA são considerados ácidos graxos essenciais (AGE), pois não podem ser sintetizados pelos animais e desta forma devem ser obtidos através da dieta (Yaqoob; Calder, 2007). A partir desses ácidos, por processo de dessaturação e alongamento através das enzimas Fads e Elovl, os animais os convertem em ácidos de graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), como o ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6 n-3), ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5 n-3) a partir do seu precursor ALA e o ácido araquidônico (ARA; 20: 4 n-6) a partir de LA. Estes LC-PUFA são necessários para diversos processos no organismo animal (Tvrzicka *et al.*, 2011; Tilami; Sampels, 2018). No entanto, o metabolismo dos ácidos ALA e LA é realizado pelas mesmas enzimas, o que gera uma competição mas o LA tem maior disponibilidade para conversão o que ocasiona menor síntese de EPA e DHA de forma endógena (Colussi *et al.*, 2017).

Assim, EPA e DHA são também adquiridos através da alimentação com destaque para os peixes que são a principal fonte de LC-PUFA para humanos, em especial o salmão. Já seu precursor ALA é encontrado em óleos derivados de soja, chia, nozes e colza por exemplo (Michalak; Mosinska; Fichna, 2016). Quanto aos peixes e outros animais, esses LC-PUFA são adquiridos pela suplementação da ração com ingredientes ricos em EPA e DHA como o óleo de peixe ou seu precursor ALA no caso de óleos vegetais (Oboh *et al.*, 2016)

Os PUFAs possuem uma importância fundamental para os diferentes animais, por participarem de diversas funções biológicas que incluem função na estrutura, fluidez e capacidade de reposta de membrana celulares, fonte de energia, precursores de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos), possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitrombóticas (Yaqoob; Calder, 2007; Tian; Lei; Ji, 2015; Bentsen, 2017; Colussi *et al.*, 2017; Zárata *et al.*, 2017; Saini; Keum, 2018). Além disso, estão envolvidos em aspectos da reprodução tanto de humanos como animais (Coyne *et al.*, 2008; Esmaeili *et al.*, 2012; Tran; Malla; Tyagi, 2017; González-Ravina *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019; Hilbig *et al.*, 2019;).

2.1.2. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) no desempenho produtivo de peixes

O acréscimo de lipídios na dieta de peixes melhora o crescimento e a eficiência alimentar, além de melhorar a utilização efetiva da proteína dietética, poupando assim a utilização da proteína como fonte de energia (Chatzifotis *et al.*, 2010; Ghanawi *et al.*, 2011). Além disso o aumento de lipídios na dieta pode melhorar o perfil de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) no músculo dos peixes, melhorando assim a qualidade da carne e beneficiando a saúde humana (Lim *et al.*, 2010; Al-Souti *et al.*, 2012).

A utilização de óleo de salmão como fonte lipídica na dieta de *A. lacustris* resultou em maior deposição de ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6 n-3) e ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5 n-3) no músculo de machos e fêmeas em comparação com a utilização do óleo vegetal (Gonçalves; Ferolli; Viegas, 2012). Oliveira *et al.* (2021) avaliaram o efeito do tempo de alimentação com dieta contendo ácido linoleico conjugado (CLA) para a mesma espécie, e também relataram um aumento linear de PUFAs na carcaça, principalmente de DHA.

Já Campelo *et al.* (2015) analisaram o efeito de diferentes níveis de CLA na dieta de *A. lacustris* e concluíram que este pode ser incluído na dieta da espécie em até 2,5% sem prejudicar a composição química da carcaça, apesar de que neste estudo foi apontado que os valores de EPA diminuíram de acordo com o aumento do CLA da dieta. Ainda para *A. lacustris* foi verificado que a associação de óleo de gergelim a diferentes fontes de lipídios na dieta alterou significativamente o perfil de ácidos graxos, em especial os ácidos linoleico, linolênico, araquidônico, eicosapentaenoico e docosaenoico (Natori *et al.*, 2016).

Para alevinos de *Puntius gonionotus* a suplementação da dieta com óleo de peixe (12%) resultou em a maior taxa de crescimento específico, índice de eficiência proteica e teor de lipídios de corpo inteiro, e a melhor taxa de conversão alimentar. Além disso, o nível de ácidos graxos saturados e poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA) no músculo aumentou significativamente com o aumento da suplementação de óleo de peixe (Nayak *et al.*, 2018). Esse efeito positivo também foi observado para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sendo que a utilização de 6%

de óleo de palma na ração melhorou o ganho de peso, a taxa de crescimento, o peso corporal final e a taxa de conversão alimentar (Ayisi; Zhao; Rupia, 2017).

No entanto a quantidade de lipídios utilizada nas dietas devem ser adequadas para cada espécie, uma vez que seu excesso pode resultar em efeito contrário, prejudicando o crescimento dos animais já que a maior quantidade de lipídios pode diminuir o consumo da ração, além de também ocasionar a deposição de gorduras (Ling *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2021). Para a carpa comum (*Cyprinus carpio*) o ganho de peso e a taxa de crescimento melhoraram com o aumento da quantidade de lipídios da dieta de 3% para 6%, no entanto, quantidades superiores ocasionaram uma diminuição significativa do desempenho de crescimento (Fan *et al.*, 2021).

Para a espécie *A. lacustris* os estudos indicaram que a inclusão de lipídios na dieta não afetam o desempenho (Campelo *et al.*, 2015; Natori *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2019). Entretanto apenas Tavares (2011), avaliando o efeito de diferentes fontes de óleos vegetais sobre o desempenho da espécie, observou uma diferença significativa para taxa de sobrevivência, porém os demais parâmetros zootécnicos não foram afetados pelas fontes de lipídios.

2.1.3. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na reprodução de peixes

O desempenho reprodutivo em peixes é influenciado dentre outros fatores pela quantidade de ácidos graxos essenciais (AGE) na dieta, tendo efeito sobre a maturação de oócitos, fertilidade, ovulação, sucesso de incubação e qualidade das larvas (Izquierdo; Fernandez-Palacios; Tacon, 2001; Li *et al.*, 2005; Furuita *et al.*, 2007). Além disso o teor de AGE em especial os PUFAs melhora a fluidez da membrana de espermatozoides, assim como pode alterar a composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide, influenciando no desempenho reprodutivo (Labbe *et al.*, 1995; Asturiano *et al.*, 2001; Beirão *et al.*, 2015).

Para tilápias do Nilo uma dieta com óleo de palma bruto resultou em maior produção de ovos, maior taxa de incubação e menor incidência de deformidade larvais (Ng; Wang, 2011). A suplementação com óleos vegetais também ocasionou maior eclosão e quantidade total de ovos para *Danio rerio* (Jaya-Ram *et al.*, 2008). Em bagres híbridos (*Pangasius larnaudii* x *Pangasianodon hypophthalmus*) a suplementação da dieta com óleo de peixe de água doce (1 e 2%) aumentou os níveis

de hormônios sexuais (17β -estradiol e testosterona), além disso foi observado um desenvolvimento avançado dos ovários e testículos (Sattang *et al.*, 2021). Em *Colisa fasciatus* a inclusão de PUFA's na dieta também ocasionou o desenvolvimento avançado dos ovários quando comparados com a dieta controle sem adição de lipídios, ou seja, o grupo tratado com PUFA's apresentou maior maturação gonadal (Hossen *et al.*, 2014). Já em *Trichopodus trichopterus* a suplementação da dieta com diferentes níveis de ácido araquidônico melhorou os parâmetros reprodutivos tais como fecundidade, diâmetro do oócito e do saco vitelino e taxa de eclosão (Asil *et al.*, 2017).

Uma dieta rica em PUFA's melhorou também o desempenho reprodutivo de machos de *Dicentrarchus labrax* L. (robalo europeu) com aumento do período de espermição, maior volume seminal, maior concentração de espermatozoides, além de maiores taxas de sobrevivência de embriões e larvas 48h e 78h pós fertilização, respectivamente (Asturiano *et al.*, 2001). Esse efeito dos PUFA's sobre a qualidade do sêmen também foi observado para a truta arco-íris, na qual a suplementação da dieta com 1 e 2% melhorou o volume espermático, a concentração espermática, porcentagem e duração da motilidade (Köprücü; Yonar; Özcan, 2015; Yonar; Köprücü; Özcan, 2020). No entanto, para a espécie alvo desse estudo, *Astyanax lacustris*, ainda não há trabalhos avaliando o efeito dos PUFA's sobre a qualidade seminal.

2.1.4. Ácidos graxos e a criopreservação

A criopreservação é uma técnica que permite o armazenamento de células e tecidos em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) por longos períodos, sem perder sua viabilidade e estrutura (Carvalho, 2012). A aplicação da técnica para espermatozoides de peixes está em crescente uso, principalmente devido à ascensão da indústria de aquicultura nos últimos anos (FAO, 2022). Pois a técnica permite, dentre vários benefícios, a redução da manutenção de estoque de peixes, abastecimento contínuo de espermatozoides evitando a assincronia reprodutiva, facilita o transporte entre pisciculturas, permite uma seleção genética e formação de banco de germoplasma, fatores esses que estão diretamente relacionados ao sucesso reprodutivo na produção de peixes, e, conseqüentemente, maior produção aquícola (Viveiros; Godinho, 2009; Cabrita *et al.*, 2010). Além disso, é uma importante ferramenta para conservação de espécies de peixes (Viveiros *et al.*, 2012).

No entanto, apesar de todos os benefícios apontados, a criopreservação de espermatozoides envolve os processos de congelamento e de descongelamento, sendo que para a execução destes, diversos fatores obrigatoriamente devem ser levados em consideração para serem realizados com o sucesso, ou seja, mantendo os gametas viáveis após a execução destes. Isto porque, a submissão das células à baixas temperaturas podem ocasionar crio injúrias a estas, principalmente pela formação de gelo intracelular ou/e extracelular, estresse oxidativo e estresse osmótico (Cabrita *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2017). Os danos podem ser, os letais e os subletais, neste último caso eles podem afetar a morfologia dos espermatozoides como flagelo e peça intermediária, a membrana dos espermatozoides, as mitocôndrias, a integridade do DNA, a motilidade e a velocidade dos espermatozoides, assim como podem causar a peroxidação lipídica pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Xin *et al.*, 2019; Motta *et al.*, 2022).

A fim de diminuir todos esses possíveis danos são utilizadas para o congelamento soluções crioprotetoras que são compostas por agente(s) crioprotetores permeável(eis) (dimetilsulfoxido, metilglicol, dimetilacetamida, propilenoglicol, etilenoglicol) e impermeável(eis) (glicose, frutose, sacarose, NaCl, lectina de soja, gema de ovo etc) que tem a função de diminuir a formação dos cristais de gelo protegendo os espermatozoides durante o processo de criopreservação (Torres *et al.*, 2022). Também são adicionados ao sêmen outras substâncias que visam maximizar a qualidade após o descongelamento, como antioxidantes para diminuir o estresse oxidativo (Sandoval-Vargas *et al.*, 2021; Motta *et al.*, 2022), proteínas anticoagulantes que inibem cristalização (Robles; Valcarce, Riesco, 2019; Abualreesh *et al.*, 2021). A adição de uma fração do próprio plasma seminal da espécie, também já demonstrou melhorar a qualidade do sêmen após o descongelamento (Shaliutina-Kolešová *et al.*, 2020).

Outra estratégia para melhorar a qualidade do sêmen após o processo de criopreservação pode ser a inclusão de lipídios na dieta, em especial dos PUFAs, ganham destaque também por melhorarem a qualidade do sêmen após o processo de criopreservação. Navarro *et al.* (2014) demonstraram essa influência para tilápia do Nilo, cujo o uso de óleo de peixe na dieta resultou em maior taxa de motilidade e duração da motilidade após o descongelamento, quando comparados a outros tipos de óleos, o que segundo ele seria devido ao óleo de peixe ser rico em PUFAs da série

ômega-3, que atuam na membrana espermática aumentando a fluidez e resistência durante o congelamento.

Para o sêmen de *Salmo trutta macrostigma* a suplementação do extensor com o ácido docosahexaenóico também resultou em uma melhoria da motilidade progressiva, duração da motilidade, viabilidade do sêmen e taxa de fertilização após o congelamento (Bozkurt; Yavas, 2021). O mesmo efeito também foi observado para o sêmen do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) onde a suplementação da solução crioprotetora com o ácido araquidônico ocasionou uma melhor taxa de motilidade e porcentagem de espermatozoides com membrana intacta após o descongelamento, aumentando ainda a taxa de fertilização pós congelamento (Díaz *et al.*, 2021).

Esse efeito benéfico dos ácidos graxos poli-insaturados para o processo criopreservação se deve principalmente ao fato da membrana espermática ser composta predominantemente por PUFAs, e essa composição de fosfolipídios e colesterol determina a permeabilidade à água e demais moléculas, além da fluidez dessa membrana, que é ditada pela temperatura e características dos ácidos graxos tais como posição das ligações duplas, grau de insaturação e interação lipídio-proteína. Normalmente, a diminuição da cadeia e aumento da insaturação dos ácidos graxos ocasionam o aumento dessa fluidez (Pustowka *et al.*, 2000; Horokhovatskyi *et al.*, 2016)

Além disso o processo de congelamento e descongelamento causa alterações na composição lipídica dessa membrana. Assim, a suplementação seja pela dieta ou diretamente na solução crioprotetora pode contrapor essas possíveis perdas na composição, evitando assim maiores danos à motilidade, aos parâmetros cinéticos dos espermatozoides, duração da motilidade, integridade da membrana, potencial mitocondrial, fertilização dentre outros (Navarro *et al.*, 2014; Bozkurt; Yavas, 2021; Díaz *et al.*, 2021). Dessa forma a crioresistência dos espermatozoides pode estar relacionada ao tipo de ácidos graxos presentes nessa membrana e à força das ligações entre os componentes da membrana do espermatozoide (Pustowka *et al.*, 2000).

Com relação a espécie em estudo, são poucos os trabalhos realizados avaliando os efeitos dos lipídios sobre o desempenho produtivo da espécie (Tavares, 2011; Campelo *et al.*, 2015; Natori *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2019) e quando

associados à qualidade e criopreservação do sêmen este é um trabalho pioneiro que irá avaliar o efeitos dos PUFA's sobre a qualidade seminal e criopreservação do sêmen da espécie com intuito de contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos nestes processos.

2.2. *Astyanax lacustris* (Lambari-do-rabo-amarelo)

A. lacustris era descrita anteriormente como *Astyanax bimaculatus* e *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britsky, 2000), porém foi revisada por Lucena e Soares (2016) como sendo *A. lacustris*. É amplamente distribuída na bacia do alto Paraná, bacia hidrográfica do Paraguai, Tocantins, São Francisco e rio Doce, sendo altamente abundante em rios e reservatórios, podendo adaptar-se facilmente a ambientes represados (Lima *et al.*, 2003; Lucena; Soares, 2016; Vidotto-Magnoni *et al.*, 2021).

Pertencente à família Characidae, sendo conhecida popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, tendo como características pequeno porte podendo atingir até 15 cm e 60g, rápido crescimento e habito alimentar onívoro (Orsi; Carvalho; Foresti, 2004; Sabbag *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Stevanato; Ostrensky, 2018). É considerada uma espécie oportunista e com desova ao logo do ano, podendo ter sua reprodução induzida em laboratório, tendo grande fecundidade e alta taxa de crescimento (Sabbag *et al.*, 2011).

A espécie apresenta dimorfismo sexual, no qual as fêmeas são maiores e os machos possuem espículas na nadadeira anal quando maduros sexualmente, o que facilita sua identificação (Garutti, 2003). Além disso possuem facilidade para aceitação de alimentação artificial e são capazes de sobreviver em ambientes limitantes em que há redução da qualidade de água e alta densidade de estocagem, o que destaca seu potencial em sistemas de aquicultura intensivos (Bertolini *et al.*, 2018).

Por esses motivos a espécie apresenta grande potencial econômico para explorar o mercado de iscas-vivas e consumo direto, sendo produzido em sua grande maioria por pequenos produtores (Fonseca; Costa-Pierce; Valenti, 2017). Ademais, é considerada uma espécie de modelo biológico, sendo por isso muito utilizada em diversas pesquisas (Bem *et al.*, 2012; Lira *et al.*, 2018; Viana *et al.*, 2018; Abdalla *et al.*, 2019; Pinheiro *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2020; Brambila-Souza *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da inclusão de ácidos graxos poli-insaturados na nutrição de machos reprodutores de *A. lacustris*, sobre o desenvolvimento corporal, qualidade seminal e a crioresistência dos espermatozoides.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar se a inclusão de níveis crescentes de óleo de peixe marinho na dieta influenciam o desempenho zootécnico da espécie;
- Avaliar possíveis alterações na composição química corporal devido a inclusão de óleo de peixe marinho na ração;
- Avaliar a influência da inclusão de óleo de peixe marinho sobre o perfil de ácidos graxos do músculo de *A. lacustris*;
- Avaliar o efeito da utilização de dietas com diferentes níveis de óleo de peixe marinho sobre as características espermáticas da espécie (coloração, motilidade total e progressiva, tempo da motilidade, volume médio, osmolalidade, concentração, morfologia, integridade da membrana e parâmetros cinéticos dos espermatozoides);
- Comparar duas soluções diluidoras na manutenção das características de qualidade do sêmen;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas, que os espermatozoides possam sofrer quando submetidos aos processos de congelamento e descongelamento;
- Determinar a composição lipídica do sêmen de *A. lacustris* após o processo de criopreservação;
- Avaliar a capacidade de fertilização do sêmen descongelado, como um indicativo de qualidade e preservação das características seminais de *A. lacustris*;
- Avaliar a criorresistência de espermatozoides de *A. lacustris* pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, R. P.; KIDA, B. M. S.; PINHEIRO, J. P. S.; OLIVEIRA, L. F.; MARTINEZ, C. B. F.; MOREIRA, R. G. Exposure to aluminum, aluminum+manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. C 215, p. 33-40, 2019.
- ABREU, M. R.; SILVA, L. M. J.; FIGUEIREDO-ARIKI, D. G.; SATO, T. T.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. **Aquaculture Research**, v. 52, p. 471-483, 2020.
- ABUALREESH, M.; MYERS, J. N.; GURBATOW, J.; JOHNSON, A.; XING, D.; WANG, J.; LI, S.; COOGAN, M.; VO, K.; HUSSEINI, N. E.; DUNHAM, R. A.; BUTTS, I. A. E. Effects of antioxidants and antifreeze proteins on cryopreservation of blue catfish (*Ictalurus furcatus*) spermatogonia. **Aquaculture**, v. 531, p.1-7, 2021.
- AGH, N.; MOZANZADEH, M. T.; JAFARI, F.; NOORI, F.; JALILI, R. The influence of dietary fish oil replacement with mixture of vegetable oils on reproductive performance, immune responses and dynamic of fatty acids during embryogenesis in *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture Research**, v. 00, p. 1-14, 2019.
- AKOH, C. C. **Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology**. (4^a Ed.), Boca Raton, FL: CRC press, 2017.
- AL-SOUTI, A.; AL-SABAHI, J.; SOUSSI, B.; GODDARD, S. The effects of fish oil-enriched diets on growth, feed conversion and fatty acid content of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. **Food Chemistry**, v. 133, p. 723,727, 2012.
- ASIL, S. M.; KENARI, A. A.; MIYANJI, G. R.; KRAAK, G. V. D. The influence of dietary arachidonic acid on growth, reproductive performance, and fatty acid composition of ovary, egg and larvae in na anabantid model fish, Blue gourami (*Trichopodus trichopterus*; Pallas, 1770). **Aquaculture**, v. 476, p. 8-18, 2017.
- ASTURIANO, J. F.; SORBERA, L. A.; CARRILLO, M.; ZANUY, S.; RAMOS, J.; NAVARRO, J. C.; 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**, v.194, p.173-190, 2001.
- AYISI, C. L.; ZHAO, J.; RUIPIA, E. J. Growth performance, feed utilization, body and fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing elevated levels of palm oil. **Aquaculture and Fisheries**, v. 2, p. 67-77, 2017.
- BANG, H. O.; DYERBERG, J. Plasma lipids and lipoproteins in greenlandic west coast eskimos. **Acta medica scandinavica**, v. 192, p. 85-94, 1972.
- BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGHETA, P. C. Omega-3 and 6 fatty acids and implications on human health. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 32, p. 129-145, 2007.

BEIRÃO, J.; SOARES, F.; POUSÃO-FERREIRA, P.; DIOGO, P.; DIAS, J.; DINIS, M. T.; HERRÁEZ, M. P.; CABRITA, E. The effect of enriched diets on *Solea senegalensis* sperm quality. **Aquaculture**, v. 435, p. 187-194, 2015.

BEM, J. C.; FONTANETTI, C. S.; SENHORINI, J.; PARISE-MALTEMPI. Effectiveness of estradiol valerate on sex reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 283-290, 2012.

BENTSEN, H. Dietary polyunsaturated fatty acids, brain function and mental health. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 28, p. 2-7, 2017.

BERTOLINI, R. M.; SENHORINI, J. A.; NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; PERES, W. A. M.; SILVA, R. C.; YASUI, G. S. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 68-74, 2018.

BOZKURT, Y.; YAVAŞ, I. Effect of supplementations of docosahexaenoic acid (DHA) into a Tris-glucose based extender on the post-thaw sperm quality, fertility and hatching rates in brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) following cryopreservation. **International Aquatic Research**, v. 13, p. 147-154, 2021.

BRAMBILA-SOUZA, G.; MYLONAS, C. C.; DE MELLO, P. H.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R.; TOLUSSI, C. E.; MOREIRA, R. G. GnRHa implants and temperature modulate Lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) induced reproduction out of the reproductive season. **Aquaculture Research**, v. 52 (11), p. 5595-5605, 2021.

CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Review article cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623–635, 2010.

CAMPELO, D. A. V.; OLIVEIRA, K. R. B.; BATISTON, W. P.; ZUANON, J. A. S.; FURUYA, W. M.; MATSUSHITA, M.; SALARO, A. L. Conjugated linoleic acid in diets for (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Bristski, 200). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 788-796, 2015.

CARVALHO, A. F. S. **Criopreservação de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*): predição do potencial de congelabilidade e uso da cafeína na solução ativadora**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CASTRO, T.; MARTINEZ, D.; ISABEL, B.; CABEZAS, A. JIMENO, V. Vegetable oils rich in polyunsaturated fatty acids supplementation of dairy cows' diets: effects on productive and reproductive performance. **Animals**, v. 9, p. 1-19, 2019.

CHATZIFOTIS, S.; PANAGIOTIDOU, M.; PAPAIOANNOU, N.; PAVLIDIS, M.; NENGAS, I.; MYLONAS, C. C. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization,

body composition and sérum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. **Aquaculture**, v. 307, p. 65-70, 2010.

CHAVES, W.; ALMEIDA, E. C.; CARNEIRO, C. L. S.; MAGNONE, L.; MARTINS, N. J. T.; BESSONART, M.; ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L. Growth performance of *Astyanax altiparanae* fed with plant and/or animal lipid sources. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 36, p. 63-70, 2019.

COLUSSI, G.; CATENA, C.; NOVELLO, M.; BERTIN, N.; SECHI, L. A. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: relevance for cardiovascular outcomes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 27, p. 1-28, 2017.

COYNE, G. S.; KENNY, D. A.; CHILDS, S.; SREENAN, J. M.; WATERS, S. M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression. of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v. 70, p. 772-782, 2008.

CRAIG, S.; KUHN, D.; SCHWARZ, M. Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding Steven. **Virginia Cooperative Extention**, p. 1–6, 2017.

DÍAZ, R.; LEE-ESTÉVEZ, M.; FIGUEROA, E.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; SEPÚLVEDA, N.; FARIAS, J. G. Study of the membrane lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) spermatozoa and its relation with semen quality. **Aquaculture Research**, p. 1-5, 2018.

DÍAZ, R.; QUIÑONES, J.; SHORT, S.; CONRERAS, P.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; CARCINO-BAIER, D.; SEPÚLVEDA, N.; VALDEBENITO, I.; FARÍAS, J. G. Effect of exogenous lipids on cryotolerance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 98, p. 25-32, 2021.

ESMAELI, V.; SHAHVERDI, A. H.; ALIZADEH, A. R.; ALIPOUR, H.; CHEHRAZI, M. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen–thawed semen and blood parameters in rams. **Andrologia**, v. 46, p. 42-49, 2012.

FAHY, E.; COTTER, D.; SUD, M.; SUBRAMANIAM, S. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1811, p. 637-647, 2011.

FAN, Z.; LI, J.; ZHANG, Y.; WU, D.; ZHENG, X.; WANG, C.; WANG, L. Excessive dietary lipid affecting growth performance, feed utilization, lipid deposition, and hepatopancreas lipometabolism of large-sized common carp (*Cyprinus carpio*). **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 1-11, 2021.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B. A.; VALENTI, W.C. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, p. 2-16, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Towards Blue Transformation. Rome, FAO 2022.

FURUITA, H.; HORI, K.; SUGITA, T.; YAMAMOTO, T. Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. **Aquaculture**, v. 267, p. 55-61, 2007.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. Editora Unesp, São Paulo, p. 56, 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia**, v.13, p. 65-88, 2000.

GHANAWI, J.; ROY, L.; DAVIS, D. A.; SAOUD, I. P. Effects of dietary lipid levels on growth performance of marbled spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus*. **Aquaculture**, v. 310, p. 395-400, 2011.

GONÇALVES, L. U.; FERROLI, F.; VIEGAS, E. M. M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1967-1974, 2012.

GONZÁLEZ-RAVINA, C.; AGUIRRE-LIPPERHEIDE, M.; PINTO, F.; MARTÍN-LOZANO, D.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M.; BLASCO, V.; SANTAMARÍA-LÓPEZ, E.; CANDENAS, L. Effect of dietary supplementation with a highly pure and concentrated docosahexaenoic acid (DHA) supplement on human sperm function. **Reproductive Biology**, v. 18, p. 282-288, 2018.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. R. **Lipid biochemistry: an introduction: Fatty acid structure and metabolism** (4ª Ed.), Chapman e Hall, Londres, p. 411, 1991.

GURR, M. I.; JAMES, A. T. **Lipid biochemistry: an introduction**. (3ª Ed.), Chapman e Hall, Londres, p. 247, 1980.

HILBIG, C. C.; NASCIMENTO, N. F.; HEINEN, A. L.; NETO, A. T.; FUNGHETTO, J. P.; BOMBARDELLI, R. A.; MEURER, F.; NAKAGHI, L. S. O. Effects of dietary fatty acids on the reproduction of South American female catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 47(3), p. 456-466, 2019.

HOROKHOVATSKYI, Y.; SAMPELS, S.; COSSON, J.; LINHART, O.; RODINA, M.; FEDOROV, P.; BLECHA, M.; DZYUBA, B. Lipid composition in common carp (*Cyprinus carpio*) sperm possessing different cryoresistance. **Cryobiology**, v. 73, p. 282-285, 2016.

HOSSEN, M. S.; REZA, A. H. M.; RAKHI, S. F.; TAKAHASHI, K.; HOSSAIN, Z. Effects of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on gonadal maturation and spawning of striped gourami, *Colisa fasciatus*. **International Aquatic Research**, v. 6, p. 1-13, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal**. Brasília, 2021.

- IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, p. 25-42, 2001.
- JANG, T. H.; PARK, S. C.; YANG, J. H.; KIM, J. Y.; SEOK, J. H.; PARK, U. S.; CHOI, C. W.; LEE, S. R.; HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, p. 6, 12-18, 2017.
- JAYA-RAM, A.; KUAH, M.; LIM, P.; KOLKOVSKI, S.; SHU-CHIEN, A. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 277 (3-4), p. 275-281, 2008.
- KALISH, B. T.; FALLON, E. M.; PUDER, M. A tutorial on fatty acid biology. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 3, p. 380-388, 2012.
- KÖPRÜCÜ, K.; YONAR, M. E.; ÖZCAN, S. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on antioxidant defense and sperm quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under regular stripping conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 135–143, 2015.
- KOTTMANN, J. S.; TOMKIEWICZ, J.; BUTTS, I. A. E.; LUND, I.; JACOBSEN, C.; STØTTRUP, J. G.; HOLST, L. Effects of essential fatty acids and feeding regimes on egg and offspring quality of European eel: Comparing reproductive success of farm-raised and wild-caught broodstock. **Aquaculture**, v. 529, p. 1-16, 2020.
- LABBE, C.; MAISSE, G.; MÜLLER, K.; ZACHOWSKI, A.; KAUSHIK, S.; LOIR, M. Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. **Lipids**, v. 30, p. 1-11, 1995.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. **Aquaculture**, v. 298, p. 118-124, 2009.
- LALL, S. P.; TIBBETTS, S. M. Nutrition, feeding n, p. a behavior of fish. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 12, p. 361-372, 2009.
- LASSEN, P. G.; CANOZZI, M. E. A.; COSTA, B. B.; BARCELLOS, J. O. J.; STREIT-JR, D. Cryopreserved semen motility of south american neotropical fish: a meta-analysis. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 30, p. 19-32, 2022.
- LI, Y.; CHEN, W.; SUN, Z.; CHEN, J.; WU, K. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. **Aquaculture**, v. 245, p. 263-272, 2005.
- LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; LI, M. H.; KLESIOUS, P. H. Growth performance, vitamin E status, and proximate and fatty acid composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing various levels of fish oil and vitamin E. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 855-866, 2010.
- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.;

- LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 106-169, 2003.
- LING, S.; KUAH, M. K.; MUHAMMAD, T. S. T.; KOLKOVSKI, S.; SHU-CHIEN, A. C. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. **Aquaculture**, v. 261, p. 204-214, 2006.
- LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R. Y.; SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S. R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, p. 1-10, 2018.
- LUCENA, C. A.; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 1, p. 101-125, 2016.
- MICHALAK, A.; MOSINSKA, P.; FICHNA, J. Polyunsaturated fatty acids and their derivatives: therapeutic value for inflammatory, functional gastrointestinal disorders, and colorectal cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1-16, 2016.
- MOTTA, N. C.; EGGER, R. C.; MONTEIRO, K. S.; OLIVEIRA, A. V.; MURGAS, L. D. S. Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, v. 179, p. 14-21, 2022.
- NATORI, M. M.; ALVES, R. C. P.; OLIVEIRA, R. H. F.; SEGURA, J. G.; VIEGAS, E. M. M. Sesame oil in diets for lambari: Effects on growth parameters, corporal chemical composition and physiological alterations. **Ciência Animal**, v. 46, p. 1274-1280, 2016.
- NAVARRO, R. D.; NAVARRO, F. K. S. P.; FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, M. M. Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis* spp.) fed diet with different oil sources. **Acta Scientiarum**, v. 36, p. 399-404, 2014.
- NAYAK, M.; SAHA, A.; PRADHAN, A.; SAMANTA, M.; MOHANTY, T. K.; GIRI, S. S. Influence of dietary lipid levels on growth, nutrient utilization, tissue fatty acid composition and desaturase gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*) fingerlings. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 226, p. 19-25, 2018.
- NG, W. K.; WANG, Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. **Aquaculture**, v. 314 (1-4), p. 122-131, 2011.
- OBOH, A.; BETANCOR, M. B.; TOCHER, D. R.; MONROIG, O. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in the African catfish *Clarias gariepinus*: Molecular

cloning and functional characterisation of fatty acyl desaturase (fads2) and elongase (elovl2) cDNAs. **Aquaculture**, v. 462, p. 70-76, 2016.

OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, p. 83-108, 2012.

OLIVEIRA, K. R. B.; CAMPELO, D. A. V.; BATISTON, W. P.; FURUYA, W. M.; ZUANON, J. A. S.; CARNEIRO, A. P. S.; FERRAZ, R. B.; SALARO, A. L. Effect of conjugated linoleic acid feeding periods on fatty acid profile and nutritional quality of *Astyanax altiparanae*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, p. 1-10, 2021.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 207-218, 2004.

PEIXES BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2022**. Associação Brasileira de Piscicultura, 2022.

PINHEIRO, J. P. S.; ASSIS, C. B.; MUÑOZ-PEÑUELA, M.; BARBOSA-JUNIOR, F.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). **Chemosphere**, v. 220, p. 266-674, 2019.

PUSTOWKA, C.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F.; LALL S. P. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. **Aquaculture Research**, V. 31(3), P. 297-305, 2000.

QIN, Y.; HE, L.; LI, Y. W. D.; CHEN, W.; YE, J. Growth performance, fatty acid composition, and lipid metabolism are altered in groupers (*Epinephelus coioides*) by dietary fish oil replacement with palm oil. **Animal Nutrition**, v. 8, p. 102-113, 2022.

ROBLES, V.; VALCARCE, D. G.; RIESCO, M. F. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. **Biomolecules**, v. 9, p. 1-12, 2019.

ROCHA, N. A.; SCHADE, G. M.; ALVES, Á. M.; SILVA, C. S.; NAKIRIMOTO, J. M.; LAURI, L. S.; CAMPOS, L. G.; SANTOS, M. G.; MESQUITA, N. N.; RELVAS, R. S.; CARNEVALE, R. F.; OH, S. Y.; GAIA, V. P. D.; KIDA, V. R.; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; SENHORINI, J. A.; SIQUEIRA, H. O.; NASCIMENTO, N. F.; SILVA, L. A.; LÁZARO, T. M.; VISINTIN, J. A.; MONZANI, P. S.; YASUI, G. S. Acute exposure to hyperosmotic conditions reduces sperm activation by urine in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*, a freshwater teleost fish. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57(3), p. 1-8, 2020.

RODRIGUES, P. G.; MOURA, R. S.; ROCHA, L. G. P.; BOTTINO, M. P.; NICHI, M.; MACULAN, R.; BERTECHINI, A. G.; SOUZA, J. C. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation improves the quality of stallion cryopreserved sêmen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 54, p. 18-23, 2017.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo amarelo em Monte Castelo/SP: um estudo de caso. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 3, p.307-315, 2011.

- SHAIKH, S. R.; EDIDIN, M. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 1277-1289, 2006.
- SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. **Life Sciences**, v. 203, p. 255-267, 2018.
- SANDOVAL-VARGAS, L.; JIMÉNEZ, M. S.; GONZÁLEZ, J. R.; VILLALOBOS, E. F.; CABRITA, E.; ISLER, I. V. Oxidative stress and use of antioxidants in fish sêmen cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, p. 365-387, 2021.
- SANTOS R. D.; GAGLIARDI A. C. M.; XAVIER H. T.; MAGNONI C. D.; CASSANI R.; LOTTENBERG A. M. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivo Brasileiro Cardiologia**, v. 100, p. 1-40, 2013.
- SANTOS, F.W.B. Nutrição de peixes de água doce: definições, perspectivas e avanços científicos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. [online]. 2014. Disponível em: http://www.higieneanimal.ufc.br/anais/anaisb/aa24_2.pdf.
- SATTANG, S.; AMORNLERDPISON, D.; TONGSIRI, S.; PALIC, D.; MENGUMPHAN, K. Effect of freshwater fish oil feed supplementation on the reproductive condition and production parameters of hybrid catfish (*Pangasius larnaudii* x *Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage, 1878) broodstock. **Aquaculture Reports**, v. 20, p. 1-7, 2021.
- SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A.; ASTIANI, S.; XIAN, M.; NIAN, R. Seminal plasma fractions can protect common carp (*Cyprinus carpio*) sperm during cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 1461-1468, 2020.
- STEVANATO, D. J.; OSTRENSKY, A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical ichthyology**, v. 16, p. 1-10, 2018.
- SUD, M.; FAHY, E.; COTTER, D.; BROWN, A.; DENNIS, E. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H. JR.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R.; RUSSELL, D. W.; SUBRAMANIAM, S. LMSD: LIPID MAPS structure database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D527–D532, 2007.
- TAVARES, M. M. **Fontes de óleos vegetais em dietas para lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*): desempenho produtivo, perfil de ácidos graxos, rendimento e composição de carcaça**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Lavras, Viçosa, 2011.
- TIAN, J. J.; LEI, C. X.; JI, H. Influence of dietary linoleic acid (18:2n-6) and a-linolenic acid (18:3n-3) ratio on fatty acid composition of different tissues in freshwater fish Songpu mirror carp, *Cyprinus Carpio*. **Aquaculture Research**, p. 1-15, 2015.
- TILAMI, S. K.; SAMPELS, S. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. **Reviews nn Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, p. 243-253, 2018.

- TORRES, T. M.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V.; PEREIRA, V. A.; FERREIRA, Y. M.; LOBATO, J. S.; PINHEIRO, R. R. R.; SALES, Y. S.; MONTENEGRO, A. R.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using different concentrations of non-permeable cryoprotectants. **Animal Reproduction**, v. 19, p. 1-12, 2022.
- TRAN, L. V.; MALLA, B. A.; TYAGI, A. K. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction — A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 622-637, 2017.
- TURCHINI, G. M.; TORSTENSEN, B. E.; NG, W. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 10-57, 2009.
- TVRZICKA, E.; KREMMYDA, L. S.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomedical Papers of the Medical**, v. 155 (2), p. 117-130, 2011.
- VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; CRISPIM, B. A.; CAVALCANTE, D. N. C.; GRISOLLA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. The response of neotropical fish species (brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 758, p. 476-485, 2018.
- VIDOTTO-MAGNONI, A. P.; KURCHEVSKI, G.; LIMA, F. P.; NOBILE, A. B.; GARCIA, D. A. Z.; CASIMIRO, A. C. R.; PEREIRA, A. D.; ORSI, M. L. Population biology of *Astyanax lacustris* (Pisces, Characiformes) in a Neotropical reservoir and its tributaries. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1-14, 2021.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 25, p. 137-150, 2009.
- VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, v. 78, p. 361-368, 2012.
- XIN, M.; NIKSIRAT, H.; SHALIUTINA-KOLESOVÁ, A.; SIDDIQUE, M. A.; STERBA, J.; BORYSHPOLETS, S.; LINHART, O. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-16, 2019.
- YAQOOB, P.; CALDER, P. Ácidos graxos e função imunológica: novos insights sobre mecanismos. **British Journal of Nutrition**, v. 98 (S1), p. S41-S45, 2007.
- YONAR, S. M.; KÖPRÜCÜ, K.; ÖZCAN, S. Dietary profile of n-3 series LC-PUFAs in rainbow trout under regular stripping condition: Semen production and quality, hepato-somatic index, haemato-immunologic values, oxidative stress and fatty acid composition of liver, muscle and sêmen. **Aquaculture Research**, v. 51, p. 370-378, 2020.

ZÁRATE, R.; JABER-VAZDEKLS, N.; TEJERA, N.; PÉREZ, J. A.; RODRÍGUEZ, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, p. 1-19, 2017.

4. CAPÍTULO I

Desempenho produtivo de *Astyanax lacustris* submetidos a dieta com diferentes níveis de óleo de peixe marinho

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito de uma dieta contendo diferentes níveis de óleo de peixe marinho (OPM) rico em PUFA- ω 3 sobre o desempenho produtivo, composição corporal e perfil de ácidos graxos do músculo de *Astyanax lacustris*. Para tal, 400 machos foram dispostos em 20 caixas de 180 L em sistema de recirculação. Os peixes receberam dietas isoproteicas (32% PB) contendo 0, 3, 6 e 9% de inclusão de óleo marinho. Foram avaliados quanto a taxa de sobrevivência, comprimento total; peso final, ganho de peso, conversão alimentar aparente, consumo diário médio da dieta, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica, eficiência de retenção de proteína bruta e energia bruta, ganho de proteína bruta e ganho de lipídio (GL), composição química corporal e determinação do perfil de ácidos graxos do músculo. Não foram observadas diferenças significativas para maioria dos parâmetros de desempenho avaliados, com exceção para GL, que foi maior com o aumento da inclusão de óleo. A inclusão de óleo afetou significativamente a porcentagem de gordura e cinzas corporal, sendo o tratamento com 9% de OPM que teve maior teor de gordura e o tratamento sem OPM com menor quantidade de cinzas. Foi observado uma alteração significativa do perfil de ácidos graxos nos músculos, com o aumento da quantidade de DHA (3% de OPM) e EPA (6 % de OPM). Assim, conclui-se que, a inclusão de óleo de peixe não melhorou o desempenho produtivo de *A. lacustris*, mas melhorou a qualidade do músculo alterando na melhoria da qualidade do perfil de ácidos graxos.

Palavras-chave: ácidos graxos poli-insaturados; lambari-do-rabo-amarelo; nutrição.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of a diet containing different levels of marine fish oil (OPM) rich in PUFAs- ω 3 on the productive performance, body composition and fatty acid profile of the muscle of *Astyanax lacustris*. For this, 400 cores were arranged in 20 boxes of 180 L in a recirculation system. Fish received isoprotein diets (32% CP) containing 0, 3, 6 and 9% marine oil inclusion. They were evaluated for survival rate, total length; final weight, weight gain, apparent feed conversion, average daily diet intake, specific growth rate, protein efficiency rate, crude protein and crude energy retention efficiency, crude protein gain and lipid (GL) gain, composition body chemistry and determination of muscle fatty acid profile. No significant differences were observed for most of the evaluated performance parameters, with the exception of GL, which was greater with increasing oil inclusion. The inclusion of oil significantly affected the percentage of body fat and ash, with the treatment with 9% OPM having the highest fat content and the treatment without OPM having the lowest amount of ash. A significant change in the fatty acid profile in the muscles was observed, with an increase in the amount of DHA (3% of OPM) and EPA (6% of OPM). Thus, it is concluded that the inclusion of fish oil did not improve the productive performance of *A. lacustris*, but it improved the quality of the muscle, changing the quality of the fatty acid profile.

Keywords: polyunsaturated fatty acids; yellowtail lambari; nutrition.

INTRODUÇÃO

Os lipídios são componentes fundamentais na nutrição de peixes, isto porque são fonte de energia principalmente para crescimento, saúde e reprodução, compõem a membrana plasmática e são precursores de outras moléculas como eicosanoides e prostaglandinas (Tocher, 2003; Shahkar *et al.*, 2016; Sattang *et al.*, 2021). Dentre esses lipídios os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) como o ácido docosaheptaenóico (DHA, 22:6 n - 3), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n -3) e ácido araquidônico (ARA, 20:4 n - 6) são os principais envolvidos nessas funções (Sargent *et al.*, 1999). Entretanto, esses ácidos são sintetizados a partir dos ácidos linoléico (LA) e linolênico (ALA), sendo estes considerados ácidos graxos essenciais, uma vez que os peixes não têm a capacidade de sintetizá-los e, a forma mais simples para fornecer esses ácidos aos peixes é a inclusão destes na dieta fornecida. (Souza; Anido; Tognon, 2007). Nesse sentido, a adição de óleo de peixe marinho que é rico nesses LC-PUFA como fonte lipídica na formulação de rações para peixes marinhos e de água doce é indicada e comumente utilizada (Turchini; Torstensen; Ng, 2009; Qin *et al.*, 2022).

O efeito desses LC-PUFAs sobre o desempenho produtivo é relatado para diversas espécies de peixes, favorecendo os parâmetros de crescimento, conversão alimentar, fator de condição, utilização da proteína da ração e tolerância ao estresse (Shahkar *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2021; Sattang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

Dietas deficientes em LC-PUFAs causam efeito negativo sobre o desempenho de peixes ocasionando por exemplo, diminuição da taxa de crescimento, alterações no metabolismo lipídico e na composição de ácidos graxos do fígado, comprometendo assim a função hepática, além de alterar a regulação de genes envolvidos na lipogênese e catabolismo (Houston *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021).

Além de todos os benefícios já citados para o desenvolvimento, saúde e desempenho produtivo dos peixes, os LC-PUFAs também são benéficos para saúde humana, estando envolvidos na melhoria e prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doença de Alzheimer e depressão, além de ter papel importante no desenvolvimento do cérebro e na saúde materno-infantil (Shahidi; Ambigaipalan, 2018). Sendo assim, o consumo de peixe rico em LC-PUFAs é uma das formas de

atendimento das necessidades destes ácidos graxos por humanos (Zarate *et al.*, 2017).

Astyanax lacustris, popularmente conhecido por lambari-do-rabo-amarelo, é uma espécie de pequeno porte, rápido crescimento e alta prolificidade sendo amplamente distribuída na bacia do alto Paraná, bacia hidrográfica do Paraguai, Tocantins, São Francisco e rio Doce, sendo altamente abundante em rios e reservatórios, podendo adaptar-se facilmente a ambientes represados (Lima *et al.*, 2003; Sabbag *et al.*, 2011; Lucena; Soares, 2016; Vidotto-Magnoni *et al.*, 2021).

O lambari-do-rabo-amarelo tem grande importância econômica devido a sua utilização para consumo humano principalmente como petisco, e também no mercado de iscas vivas (Sabbag *et al.*, 2011; Abreu *et al.*, 2021). A produção de 599,380 quilogramas em 2021, significou um aumento de 155% em relação a 2016 (234,711kg), com grande destaque para o aumento da produção nas regiões Sul e Sudeste, principalmente em pequenas comunidades rurais (Fonseca; Costa-Pierce; Valenti, 2017; IBGE 2021). Além disso a espécie é considerada um modelo biológico para estudos nas áreas de aquicultura, reprodução, ecotoxicologia e nutrição (Yasui *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2017; Lira *et al.*, 2018; Abdalla *et al.*, 2019; Chaves *et al.*, 2019; Carneiro-Leite *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2021; Assis *et al.*, 2021; Merçon *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2021; Pinheiro *et al.*, 2021; Quirino *et al.*, 2021).

No entanto, apesar desses diversos trabalhos produzidos, nenhum estudo sobre o nível ideal de lipídios na dieta para lambari foi publicado até momento. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma dieta contendo diferentes níveis de óleo de peixe marinho (0, 3, 6 e 9%), rico em PUFA- ω 3 sobre o desempenho zootécnico, composição corporal e perfil de ácidos graxos do músculo, fígado e testículo de *Astyanax lacustris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, no Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO). Todos os procedimentos propostos estavam dentro dos parâmetros aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira no processo CEUA- 12/2019 FEIS/UNESP.

Foram utilizados 400 machos de *A. lacustris*, com peso médio inicial de $2,08 \pm 0,44$ g e comprimento total médio inicial de $5,4 \pm 0,39$ cm. Os animais foram distribuídos em 20 caixas de polietileno de 180 litros em um sistema de recirculação de água fechado, com uma densidade de 20 peixes por caixa. As variáveis físico-químicas da água dos tanques foi monitorada pela manhã e à tarde durante todo o período experimental, utilizando o medidor multiparâmetros (ASKO - AK88v2). Já a amônia total e nitrito foram mensurados três vezes na semana, utilizando o Kit Testes Alcon Labcon.

Tabela 1. Variáveis de qualidade de água registradas durante o período experimental de 105 dias.

Variáveis	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
Temperatura (°C)	28,5±2,01	28,4±1,91	28,6±1,97	28,5±1,96
pH	7,9±0,36	7,8±0,33	7,7±0,32	7,8±0,27
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	4,9±2,50	5,2±2,44	5,6±1,13	4,9±2,31
Amônia total (ppm)	0	0	0	0
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	334±61,31	321±27,50	328±17,06	336±31,78
Nitrito (µg L ⁻¹)	0	0	0	0

Fonte: próprio autor.

Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Os tratamentos foram compostos por quatro níveis inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) rico em PUFAs-ô3: 0 - ração sem inclusão de PUFAs-ô3 (0% de OPM); 3 - ração com inclusão de 3% de PUFAs-ô3 (3% de OPM); 6 - ração com inclusão de 6%

de PUFA- ω 3 (6% de OPM) e; 9 - ração com inclusão de 9% de PUFA- ω 3 (9% de OPM). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9h e 17h) até a saciedade aparente durante 105 dias.

Rações experimentais

Foram formuladas 4 dietas isoproteicas distintas (32% PB) (Tabela 2) com três níveis de inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) purificado contendo altos níveis de PUFA- ω 3 (3, 6 e 9% na dieta) e um dieta controle sem inclusão de óleo (0%), totalizando quatro tratamentos. Para o preparo das dietas, os ingredientes foram triturados, misturados, umedecidos e processados em extrusora Exteec, modelo Ex Micro, com matriz de 3 mm. Antes do processamento da ração, as mesmas foram submetidas à análises bromatológicas (Laboratório de Bromatologia, UNESP, Campus de Ilha Solteira) (Tabela 2), bem como análise do perfil de ácidos graxos do óleo de peixe marinho e das quatro dietas (Laboratório de Estudos de Fisiologia Animal, UNESP, Campus Ilha Solteira e Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, USP/ Campus São Paulo) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2. Ingredientes e composição centesimal de dietas experimentais para reprodutores de *Astyanax lacustris* (valores expressos em % da matéria natural).

Ingredientes (%)	Dietas experimentais (%)			
	0	3	6	9
Farelo de soja	31,00	32,00	32,00	32,50
Milho	22,27	24,37	17,97	14,00
Quirera de arroz	16,00	10,90	14,00	12,70
Farinha de peixe (tilápia)	15,00	15,00	15,30	15,00
Glúten de milho	7,00	7,00	7,00	7,00
Farelo de trigo	6,00	5,00	5,00	7,22
Óleo de peixe marinho	0,00	3,00	6,00	9,00
Fosfato bicálcio	1,50	1,50	1,45	1,40
Calcário	0,40	0,40	0,45	0,35
Premix ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT, antioxidante	0,30	0,30	0,30	0,30
Antifúngico (Filax)	0,03	0,03	0,03	0,03
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
Calculada²				
Matéria Seca (%)	91,54	91,88	92,06	92,29
Proteína Bruta (%)	32,00	32,00	32,00	32,00
Extrato Etéreo (%)	3,11	6,11	8,96	11,84
Matéria Mineral (%)	7,12	7,15	7,15	7,17
Fibra Bruta (%)	2,84	2,77	2,69	2,90
Extrato Não Nitrogenado ³ (%)	44,09	41,47	38,89	36,15
Energia Bruta (kcal/kg)	3,965	4,136	4,293	4,464
Cálcio	1,50	1,50	1,53	1,46
Fósforo	0,75	0,75	0,75	0,73
Lisina	1,90	1,91	1,92	1,92
Metionina	0,67	0,66	0,66	0,65

⁽¹⁾ Mineral mix (Premix Raguife; Santa fé do Sul. SP. Brasil) por 5 Kg por tonelada: Fe 20,00 g/kg; Cu 3.500,00 mg/kg; Zn 24,00 g/kg; I 160,00 mg/kg; Mn 10,00 mg/kg; Se 100,00 mg/kg; Co 80,00 mg/kg; vitamina A 2.400.000,00 UI/kg; vitamina D3 600.000,00 UI/kg; vitamina E 30.000,00 UI/kg; vitamina K3 3.000,00 mg/kg; vitamina C 60,00 g/kg; vitamina B1 4.000,00 mg/kg; vitamina B2 4.000,00 mg/kg; vitamina B6 3.500,00 mg/kg; vitamina B12 8.000,00 mcg/kg; inositol 25,00 g/kg; colina 100,00 g/kg; Ac pantotênico 10,00 g/kg; biotina 200,00 mg/kg; Ac. Fólico 1.200,00 mg/kg; niacina 20,00 g/kg; antioxidante *etc 5.000,00 mg/kg. ⁽²⁾ Com base na análise da composição dos ingredientes. ⁽³⁾ Extrato isento de nitrogênio (NFE) = matéria seca - (proteína bruta + lipídeo + matéria mineral + fibra bruta). **Fonte:** próprio autor.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) de óleo de peixe marinho utilizado na composição de dietas experimentais para reprodutores de *Astyanax lacustris*.

Ácidos graxos	Óleo de peixe
C18:0	0,78
C18:1	1,12
C18:2n6	4,41
C18:3n3	31,92
C20:4n3	7,95
C20:5n3	8,98
C22:5n3	35,29
C22:6n3	9,54

Fonte: próprio autor.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos (%) detectado nas quatro dietas fornecidas aos reprodutores *Astyanax lacustris*.

Ácidos Graxos (%)	Dietas experimentais (%)			
	0	3	6	9
C14:0	1,65	1,54	1,67	1,94
C16:0	20,00	16,95	8,87	9,41
C16:1	3,04	2,92	4,50	3,34
C18:0	3,85	4,25	5,02	4,43
C18:1	31,42	6,32	6,68	5,74
C18:2n6 (LA)	34,36	16,38	7,82	7,10
C18:3n3 (ALA)	0,28	2,15	3,17	2,30
C18:3n6	1,82	7,41	4,50	1,16
C18:4n3	0,72	4,28	6,09	4,50
C20:2n6	0,00	1,56	0,35	0,96
C20:3n6	0,30	4,14	3,74	4,51
C20:4n6 (ARA)	0,66	8,14	7,66	5,07
C20:5n3 (EPA)	0,72	8,96	11,40	18,80
C22:5n3	0,14	1,71	1,91	2,39
C22:6n3 (DHA)	1,20	13,25	27,24	27,37
SAT	25,50	22,74	15,56	15,78
MUFA	34,47	9,24	11,18	9,08
PUFA	40,18	67,99	73,88	74,16
PUFAn6	37,13	37,64	24,07	18,80
PUFAn3	3,05	30,35	49,81	55,36

Fonte: próprio autor.

Avaliação do desempenho produtivo

Para avaliação dos parâmetros de desempenho, no final do período experimental os peixes foram pesados e medidos e o desempenho foi verificado pela taxa de sobrevivência (TS), peso final (PF), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CA), consumo diário médio da dieta (CDD), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência proteica (TEP), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Sobrevivência (S)} = \frac{n^{\circ} \text{ inicial de peixes} - n^{\circ} \text{ final de peixes}}{n^{\circ} \text{ inicial de peixes}} \times 100$$

$$\text{Ganho em peso médio (GP)} = \text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}$$

$$\text{Consumo diário médio de dieta (CDD)} = \frac{\text{consumo de dieta por peixe}}{\text{tempo (dias)}}$$

$$\text{Conversão alimentar aparente (CA)} = \frac{\text{consumo da dieta}}{\text{ganho em peso}}$$

$$\text{Taxa de eficiência proteica (TEP)} = \frac{\text{ganho em peso vivo}}{\text{proteína bruta consumida}}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (TCE)} = \frac{\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial} \times 100}{\text{tempo (dias)}}$$

Análise da composição química corporal

Para determinar a composição corporal inicial foi utilizada uma amostra de 15 peixes, e na composição corporal final a mostra foi de 3 peixes por unidade experimental. Para isso os peixes ficaram em jejum por um período de 24 horas, após foram eutanasiados em benzocaína a 1% e congelados em freezer para posterior análise bromatológica.

Para a análise bromatológica os peixes foram picados com as vísceras e secos em estufa a 55°C por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram trituradas em moinho de bola para que pudessem ser realizadas as análises de composição corporal. Foram realizadas as análises de umidade, matéria mineral, proteína e extrato etéreo. A proteína bruta das amostras foi obtida pelo método de Kjeldahl e usado o fator 6,25 para multiplicação e correção dos dados. Para determinação do extrato etéreo foi realizado a extração com éter de petróleo em aparelho Soxhlet por 5 horas.

As cinzas foram determinadas em mufla a 550°C durante 4 horas, por incineração. A umidade foi obtida em estufa a 105°C por 12 horas. As metodologias utilizadas foram de acordo com Silva e Queiroz (2002) e foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da UNESP/FEIS.

Com os resultados da composição corporal e do desempenho, foram então realizados os cálculos de eficiência de retenção de proteína bruta (ER_{PB}) e energia bruta (ER_{EB}), ganho de proteína bruta (G_{PB}) e ganho de lipídio (GL) de acordo com as seguintes formulas:

$$\text{Ganho em proteína bruta (G}_{PB}(g)) = \frac{[(PBf \times Pf) - (PBi \times Pi) \times 100]}{GP/\text{peixe}}$$

$$\text{Ganho em lipídio (G}_{L}(g)) = \frac{[EEf \times Pf) - (EEi \times Pi) \times 100]}{GP/\text{peixe}}$$

$$\text{Eficiência de retenção de proteína bruta (ER}_{PB}(\%)) = \frac{[(PBf \times Pf) - (PBi \times Pi) \times 100]}{CPB}$$

$$\text{Eficiência de retenção de energia bruta (ER}_{EB}(\%)) = \frac{[EBf \times Pf) - (EBi \times Pi) \times 100]}{CEB}$$

Onde:

PBf, EBf e EEf: proteína bruta, energia bruta e extrato etéreo final na carcaça;

PBi, EBi e EEi: proteína bruta, energia bruta e extrato etéreo inicial na carcaça;

CPB: consumo de proteína bruta;

CEB: consumo de energia bruta;

GP: ganho em peso/peixe;

Pi, e Pf: peso médio inicial e final da amostra.

Além de todas as análises citadas acima foi mensurado o peso do fígado e gordura visceral para cálculo do índice hepato-somático (IHS) e índice gorduro-viscero-somático (IGVS) dos peixes ao final do período experimental, os índices foram calculados de acordo com as formulas abaixo:

$$\text{Índice hepato – somático (IHS \%)} = \frac{P_{\text{fígado}}}{P_t \text{ peixe}} \times 100$$

$$\text{Índice gorduro – víscero – somático (IGVS \%)} = \frac{P_{gv}}{P_{tpeixe}} \times 100$$

Onde:

$P_{\text{fígado}}$: peso do fígado;

P_{gv} : peso da gordura visceral;

P_t : peso total do peixe.

Análise do perfil de ácidos graxos dos tecidos

Para análise do perfil de ácidos graxos, foram coletadas amostras de músculo de quatro animais de cada um dos tratamentos (0, 3, 6 e 9%) após 105 de experimento, além de uma coleta inicial realizada antes do início do experimento, essas amostras foram armazenadas a -80°C até a realização das análises. Após 1 ano de experimento foram realizadas ainda coleta de músculo, fígado e testículo para análise do perfil de AG.

O perfil de ácidos graxos das frações totais dos tecidos muscular (300 mg), hepático (30 mg), gonadal (160 mg) foram analisados por transmetilação direta, utilizando método descrito por Parish *et al.* (2015). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em 3 mL da solução metanol: diclorometano: ácido clorídrico concentrado (10: 1: 1 v:v:v) e mantidas em banho-maria por 2 horas a 80°C . Após a retirada e resfriamento, foram adicionados 1mL de água destilada, 1,8 mL de solução hexano: diclorometano (4:1 v:v). Após, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e a camada superior orgânica removida e transferida para vials de injeção.

A determinação do perfil dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás (Varian GC 3900) acoplado a onizador de chama (FID) e auto-injetor. A identificação dessas moléculas foi feita com base nos tempos de retenção, utilizando-se padrões compostos de metil ésteres (FAME) (SUPELCO, 37 components, Larodan Chemical Company - Mixture Me93 e Qualmix PUFA fish M - Menhaden Oil), com resultados expressos em % .

Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade dos erros e homoscedasticidade das variâncias e submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando detectados diferenças significativas nas variáveis analisadas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade no programa SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

RESULTADOS

Desempenho produtivo

Para nenhum dos parâmetros analisados foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, com exceção do ganho de lipídio (G_L) que foi maior com o aumento da inclusão de óleo de peixe marinho. Com relação aos índices hepato-somático (IHS) e gorduro-víscero-somático (IGVS) também não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 5. Desempenho de juvenis de lambaris alimentados por 105 dias com rações com diferentes níveis de óleo de peixe marinho.

Parâmetros	Nível de Inclusão de Óleo (%)				ANOVA Valores de P	Valores de F
	0	3	6	9		
Peso inicial (PI) (g)	2,03±0,07 *	2,16±0,09	2,10±0,08	2,05±0,14	0,2475	1,52
Peso final (PF) (g)	4,87±0,20	4,70±0,13	4,99±0,27	4,90±0,43	0,4375	0,96
Comprimento total (CT) (cm)	7,03±0,10	7,06±0,07	7,17±0,20	7,15±0,19	0,3874	1,08
Sobrevivência (%)	94,40±6,06	93,60±6,06	91,20±3,35	87,20±4,39	0,1534	2,01
Ganho em peso (GP) (g)	2,84±0,13	2,54±0,17	2,90±0,27	2,84±0,36	0,14	2,1
Consumo médio de dieta/peixe (CDD) (g)	7,82±1,05	6,88±0,39	7,18±0,43	6,95±0,52	0,7485	0,41
Conversão alimentar aparente (CA)	2,62±0,94	2,71±0,83	2,58±0,98	2,31±0,84	0,4022	0,99
Taxa de eficiência proteica (TEP)	1,24±0,15	1,16±0,12	1,26±0,11	1,28±0,13	0,4896	0,84
Taxa de crescimento específico (TCE) (%/dia)	0,83±0,01	0,74±0,05	0,83±0,06	0,82±0,07	0,04	3,43
Eficiência de retenção de proteína bruta (ER _{PB}) (%)	22,55±2,89	20,88±1,98	23,60±2,59	23,18±2,01	0,3267	1,24
Eficiência de retenção de energia bruta (ER _{EB}) (%)	53,23±6,52	48,57±4,66	49,17±4,19	48,90±4,67	0,451	0,93
Ganho em proteína bruta (G _{PB}) (g)	18,22±0,22	18,04±0,47	18,69±1,22	18,16±0,50	0,5059	0,81
Ganho em lipídio (G _L) (g)	11,04±0,05 D	14,86±0,46 C	16,01±0,45 B	17,06±0,69 A	<,0001	155,28
Índice hepato-somático (IHS) (%)	0,81±0,09	0,68±0,09	0,74±0,07	0,66±0,08	0,049	3,26
Índice gorduro-víscero-somático (IGVS) (%)	0,23±0,07	0,22±0,13	0,35±0,16	0,20±0,11	0,2557	1,49

* valores são média ± desvio padrão.

Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si (Tukey p>0,05). **Fonte:** próprio autor.

Composição química corporal

Para os dados de composição corporal dos peixes, os níveis de PUFA- ω 3 determinaram diferenças apenas para os teores de gorduras ($p = 0,0424$) e teores de cinzas ($p = 0,0042$) (Tabela 6). O teor de gordura só diferiu ($p < 0,05$) entre o tratamento sem inclusão de OPM e inclusão de 9% de OPM (Tabela 6). A porcentagem de cinzas foi maior ($p < 0,05$) para o tratamento isento de óleo de peixe marinho (0% de OPM), enquanto entre os tratamentos com inclusão dos níveis de óleo foram semelhantes entre si (Tabela 06).

Tabela 6. Composição química corporal média de juvenis de lambaris alimentados com diferentes níveis de óleo de peixe marinho por 105 dias (valores expressos em % de matéria natural).

Parâmetros	Nível de Inclusão de Óleo (%)				ANOVA Valores de P	Valores de F
	0	3	6	9		
Matéria Seca (%)	30,04 \pm 0,23*	29,66 \pm 0,85	29,65 \pm 0,62	29,57 \pm 0,96	0,7394	0,42
Proteína Bruta (%)	17,54 \pm 0,13	17,37 \pm 0,25	17,81 \pm 0,71	17,50 \pm 0,26	0,3896	1,07
Gordura (%)	8,64 \pm 2,01 B	10,45 \pm 1,98 AB	11,48 \pm 1,24 AB	12,08 \pm 1,93 A	0,0424	3,43
Cinzas (%)	2,17 \pm 0,33 A	1,70 \pm 0,24 B	1,65 \pm 0,11 B	1,53 \pm 0,24 B	0,0042	6,57
Fibra Bruta (%)	0,14 \pm 0,05	0,17 \pm 0,06	0,09 \pm 0,01	0,20 \pm 0,10	0,0868	2,62
Energia Bruta (cal g ⁻¹)	5,407 \pm 71,14	5,383 \pm 58,29	5,331 \pm 110,43	5,350 \pm 72,29	0,6767	0,53

*média \pm desvio padrão

Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si (Tukey $p > 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

Perfil de ácidos graxos do músculo com 105 dias de alimentação

Quinze ácidos graxos foram encontrados no tecido muscular dos peixes, sendo ácidos graxos saturados (SAT), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) (Tabela 7). Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) para ácido esteárico (C:18:0), sendo as menores quantidades determinadas pelos níveis de 3% e 6% de OPM. O ácido oleico (C18:1n9) também apresentou diferença entre os tratamentos com 6 e 9% de OPM. Com relação aos ácidos graxos poli-insaturados, foram observadas diferenças significativas para o ácido linolênico (C18:3n3, ALA) onde houve foi observada diferença significativa entre os tratamentos sem inclusão de OPM e o com 9% de OPM. O ácido eicosadienóico (C20:2n6) aumentou substancialmente

($p < 0,05$) no tratamento com 9% de inclusão de óleo de peixe marinho e este diferiu dos demais tratamentos e da coleta inicial (Tabela 7).

Com relação aos ácidos ARA (ácido araquidônico, $20:4n-6$), EPA (ácido eicosapentaenóico $20:5n-3$) e DHA (ácido docosahexaenóico, $C22:6n3$) apenas DHA apresentou diferença estatística sendo sua maior concentração observada no tratamento com 3% de inclusão de OPM diferindo dos tratamentos sem inclusão, 6% de inclusão de OPM e da coleta inicial (Tabela 7).

Com relação ao total de ácidos graxos apenas os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com 6 e 9% de inclusão de OPM. Para a razão $n6/n3$ foi observada diferença estatística entre a coleta inicial e tratamento com 9% de inclusão de óleo de peixe marinho (Tabela 7).

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) do músculo de lambaris alimentados com rações contendo diferentes níveis de óleo de peixe marinho por um período de 105 dias.

Ácidos Graxos (%)	Coleta Inicial	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
		0	3	6	9
C14:0	1,28±0,4*	2,20±1,0	2,34±2,7	2,64±0,8	1,83±1,5
C16:0	9,82±5,4	10,85±1,5	4,73±3,1	9,88±5,8	9,87±3,9
C16:1	4,53±3,6	4,28±1,6	2,33±1,1	3,75±2,3	2,65±2,2
C18:0	12,83±7,4 A	9,89±4,2 A	5,33 a±3,2 B	5,18±2,6 B	7,20±0,7 AB
C18:1n9	11,97±2,8 AB	10,34± 7,6 AB	8,70±4,8 AB	16,28±3,9 A	2,87±2,8 B
C18:2n6 (LA)	2,28±1,9	2,17±1,8	2,71±1,6	3,50±1,7	6,40±5,9
C18:3n3 (ALA)	7,57±4,3 AB	9,63±1,1 A	7,62±2,1 AB	4,63±3,2 AB	3,53±1,4 B
C18:3n6	1,70±1,3	3,50±1,1	2,49±2,2	2,50±0,6	2,54±1,9
C18:4n3	9,33±3,0	9,09±1,3	9,55±3,8	7,04±4,3	13,60±3,2
C20:2n6	5,08±3,2 B	5,12±0,8 B	3,84±1,8 B	5,53±2,0 B	12,56±3,6 A
C20:3n6	3,84±4,2	6,05±4,7	3,97±5,8	3,30±3,0	1,46±0,7
C20:4n6 (ARA)	8,91±4,72	9,63±2,4	17,65±4,7	14,24±3,8	13,19±4,2
C20:5n3 (EPA)	2,05±1,7	2,77±3,1	2,59±3,2	4,35±1,9	3,61±4,2
C22:5n3	10,57±7,1	6,56±4,4	8,82±9,6	9,74±5,6	7,08±3,1
C22:6n3 (DHA)	8,20±3,0 B	7,91±0,9 B	17,33±2,7 A	7,45±1,6 B	11,61±5,6 AB
SAT	23,94±9,14	22,95±5,5	12,40±8,4	17,69±7,3	18,90±4,8
MUFA	16,51±4,6 AB	14,63±7,5 AB	11,03±5,2 AB	20,03±5,4 A	5,52±4,9 B
PUFA	59,55±12,7	62,42±4,5	76,58±10,7	62,28±8,48	75,58±9,1
PUFAn6	21,83±9,4	26,47±5,6	30,67±3,2	29,07±7,2	36,15±9,6
PUFAn3	28,39±4,5	26,86±4,5	36,36±7,3	26,17±3,2	25,83±6,3
n6/n3	0,78±0,3 B	1,03±0,3 AB	0,86±0,1 AB	1,10±0,2 AB	1,52±0,6 A

*média±desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si (Tukey p>0,05).

Fonte: próprio autor.

Perfil de ácidos graxos do músculo, fígado e gônada com 1 ano de alimentação

Músculo

Para o tecido muscular foram observadas diferenças significativas para diversos ácidos graxos após 1 ano de alimentação (Tabela 8). O ácido palmítico (C16:0) aumentou substancialmente nos tratamentos quando comparado com a coleta inicial, sendo maior (p<0,05) nos tratamentos sem inclusão de OPM e 3% de inclusão de OPM e estes diferiram (p<0,05) dos demais tratamentos e da coleta inicial. Efeito contrário foi observado para o ácido graxo palmitoléico (C16:1) que teve sua maior concentração na coleta inicial e está diferiu estatisticamente dos tratamentos 6 e 9% de inclusão de OPM. Já o ácido oleico

(C18:1n9) foi maior no tratamento 6% de inclusão de OPM e este diferiu dos tratamentos com 3%, 9% de inclusão de OPM e da coleta inicial. Para o LA houve diferença significativa apenas nos tratamentos de 0, 3 e 9% de inclusão de óleo de peixe marinho em relação a coleta inicial (Tabela 8).

Também não foram observadas diferença significativa entre os tratamentos para os ácidos linolênico (C18:3n3, ALA) e estearidônico (C18:4n3), e suas quantidades nos tratamentos diminuíram consideravelmente quando comparado a coleta inicial que diferiu dos quatros tratamentos. O ácido eicosadienóico (C20:2n6) teve maior quantidade na coleta inicial diferindo ($p < 0,05$) dos quatros tratamentos. O ácido eicosapentaenóico (C22:5n3) também foi maior na coleta inicial, porém essa diferiu apenas dos tratamentos sem inclusão de OPM e 3% de OPM (Tabela 8).

A maior ($p < 0,05$) concentração de ácidos graxos saturados foi observada na dieta isenta de óleo de peixe marinho, diferindo ($p < 0,05$) dos tratamentos com 6%, 9% de inclusão de OPM e da coleta inicial. Já para os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, mas os quatros tratamentos diferiram da coleta inicial. Também foi observada diferença significativa para porcentagem de PUFAs e PUFAs-n3 sendo maior na coleta inicial e está diferiu de todos os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) do músculo de lambaris alimentados com rações contendo diferentes níveis de óleo de peixe marinho, por um período de 1 ano.

Ácidos Graxos (%)	Nível de Inclusão de Óleo (%)				
	Coleta Inicial	0	3	6	9
C14:0	1,28±0,4*	0,75±0,2	0,90±0,1	1,26±0,8	0,77±0,1
C16:0	9,82±5,4 C	28,33±1,0 A	28,93±0,2 A	23,78±1,8 B	26,49±1,9 B
C16:1	4,53±3,6 A	1,69±0,5 ABC	1,79±0,2 AB	1,14±0,2 C	1,24±0,2 BC
C18:0	12,83±7,4	16,72±3,3	14,96±2,6	15,34±0,9	17,03±1,5
C18:1n9	11,97±2,8 C	24,85±1,9 AB	22,44±0,5 B	25,08±1,7 A	22,07±1,7 B
C18:2n6 (LA)	2,28±1,9 B	7,45±1,4 A	7,62±1,9 A	5,13±0,5 AB	6,79±0,4 A
C18:3n3 (ALA)	7,57±4,3 A	0,71±0,5 B	0,54±0,3 B	1,57±2,1 B	0,61±0,2 B
C18:3n6	1,70±1,3 A	0,28±0,1 AB	0,33±0,2 AB	0,10±0,06 B	0,09±0,05 B
C18:4n3	9,33±3,0 A	0,65±0,5 B	0,50±0,3 B	1,78±2,3 B	0,67±0,08 B
C20:2n6	5,08±3,2 A	1,12±0,3 C	1,20±0,06 C	2,70±1,0 B	1,69±0,1 B
C20:3n6	3,84±4,2	1,69±0,3	1,51±0,04	2,02±0,5	1,75±0,2
C20:4n6 (ARA)	8,91±4,72	4,68±1,0	5,07±0,1	7,36±2,5	6,82±1,3
C20:5n3 (EPA)	2,05±1,7	2,75±1,2	4,53±0,5	3,14±0,7	2,66±0,4
C22:5n3	10,57±7,1 A	2,16±0,6 B	2,35±0,2 B	6,39±2,9 A	4,66±1,96 A
C22:6n3 (DHA)	8,20±3,0	6,19±2,2	7,33±0,8	3,19±1,2	6,64±2,8
SAT	23,94±9,14 C	45,80±4,0 A	44,78±2,6 AB	40,39±2,3 BC	44,29±3,6 AB
MUFA	16,51±4,6 B	26,54±2,4 A	24,23±0,7 A	26,22±1,7 A	23,31±1,8 A
PUFA	59,55±12,7 A	27,66±3,0 C	30,99±1,8 BC	33,39±2,3 B	32,37±4,8 BC
PUFA N6	21,83±9,4	14,93±1,8	15,41±1,7	17,22±2,4	17,05±0,7
PUFA N3	28,39±4,5 A	12,45±1,5 C	15,25±0,3 BC	16,07±2,1 B	15,24±4,1 BC
n6/n3	0,78±0,3	1,20±0,1	1,01±0,09	1,10±0,2	1,17±0,2

*média±desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si (Tukey p>0,05). **Fonte:** próprio autor.

Fígado

Para o perfil de ácidos graxos do fígado, só foi observada diferença significativa para porcentagem de ácidos graxos saturados (SAT), com maior ($p<0,05$) concentração para a dieta isenta de OPM e com 3% de OPM (Tabela 9).

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) do fígado de machos de lambaris alimentados com rações contendo diferentes níveis de óleo de peixe marinho, por um período de 1 ano.

Ácidos Graxos (%)	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
C14:0	0,99±0,1*	2,41±2,5	1,26±0,3	1,71±0,8
C16:0	26,37±2,7	23,74±2,1	21,29±1,6	24,12±2,8
C16:1	4,02±0,1	3,51±1,1	3,35±1,0	3,57±1,5
C18:0	13,32±1,0	14,28±2,3	12,54±0,9	12,58±1,6
C18:1n9	38,23±3,9	31,93±10,7	33,57±3,6	26,62±6,3
C18:2n6 (LA)	3,75±0,2	4,19±1,0	6,28±1,6	5,91±1,8
C18:3n3 (ALA)	1,32±0,8	1,40±1,4	4,53±3,4	1,40±0,5
C18:3n6	0,19±0,06	0,32±0,2	0,23±0,07	0,31±0,1
C18:4n3	1,01±0,7	0,96±0,9	2,43±2,3	1,08±0,3
C20:2n6	1,08±0,2	1,28±0,5	2,08±0,6	1,07±0,1
C20:3n6	1,2±0,1	1,38±1,0	1,91±0,2	1,60±0,4
C20:4n6 (ARA)	3,73±0,3	4,02±4,0	4,08±1,2	3,40±1,1
C20:5n3 (EPA)	2,50±1,1	5,42±4,6	1,93±0,5	11,11±5,7
C22:5n3	1,5±0,3	1,32±1,3	1,56±0,6	1,01±0,5
C22:6n3 (DHA)	0,78±0,1	3,84±4,7	2,02±0,9	3,51±2,6
SAT	40,68±3,9 A	40,43±4,1 A	35,09±0,3 B	38,40±1,7 AB
MUFA	42,26±3,8	35,44±11,6	36,92±4,6	32,19±7,7
PUFA	17,07±2,8	24,13±10,0	27,05±5,8	29,41±8,3
PUFA N6	9,77±0,9	10,87±5,9	14,36±2,2	11,98±1,7
PUFA N3	7,10±2,5	12,94±6,4	12,46±6,0	17,11±8,8

*média±desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si (Tukey $p>0,05$). Fonte: próprio autor.

Testículo

O perfil de ácidos graxos do testículo foi influenciado significativamente pela inclusão de óleo de peixe marinho (Tabela 10). O ácido gama linolênico (C18:3n6) teve maiores valores nos tratamentos isento de OPM e 3% de OPM e estes diferiram estatisticamente dos tratamentos com maior inclusão (6% e 9% de OPM). O ácido eicosadienóico (C20:2n6) foi maior no tratamento com 9% de inclusão de OPM e este diferiu apenas do tratamento com 3% de OPM. Também foi observada diferença estatística para o ácido eicosapentaenoico (C20:5n3, EPA) que teve seu menor valor no tratamento com 3% de OPM e este diferiu dos demais tratamentos. Já o ácido eicosapentaenoico (C22:5n3) teve maior valor no tratamento sem inclusão de óleo de peixe marinho e este diferiu

estatisticamente dos demais tratamentos. Para os demais ácidos graxos não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 10).

Tabela 10. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) do testículo de lambaris alimentados com rações contendo diferentes níveis de óleo de peixe marinho, por um período de 1 ano.

Ácidos Graxos (%)	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
C14:0	0,85±0,2*	0,89±0,6	0,65±0,4	0,81±0,2
C16:0	20,46±1,6	19,48±1,9	18,53±2,4	17,52±0,9
C16:1	3,00±0,3	3,07±0,2	3,53±0,7	2,74±0,1
C18:0	9,75±0,4	9,09±1,0	8,60±0,5	9,04±2,2
C18:1n9	47,17±4,4	56,19±6,4	52,44±8,9	51,96±3,5
C18:2n6 (LA)	4,56±2,0	3,08±1,7	5,54±1,9	4,71±3,4
C18:3n3 (ALA)	0,29±0,1	0,44±0,4	0,32±0,2	1,35±1,2
C18:3n6	0,27±0,05 A	0,46±0,3 A	0,11±0,07 B	0,06±0,03 B
C18:4n3	0,34±0,08	0,53±0,2	0,50±0,4	1,28±1,3
C20:2n6	1,03±0,1 AB	0,63±0,2 B	1,04±0,1 AB	1,79±0,5 A
C20:3n6	1,01±0,2	0,70±0,2	0,90±0,2	0,89±0,6
C20:4n6 (ARA)	5,11±0,6	3,01±0,6	2,98±1,0	2,66±1,2
C20:5n3 (EPA)	1,70±0,1 A	0,22±0,1 B	1,71±0,5 A	2,37±1,7 A
C22:5n3	3,35±0,5 A	0,89±0,5 B	1,16±0,4 B	1,32±0,7 B
C22:6n3 (DHA)	1,12±0,3	1,32±1,0	2,00±0,9	1,46±0,8
SAT	31,06±1,3	29,46±2,9	27,78±3,1	27,37±2,9
MUFA	50,17±4,1	59,27±6,4	55,96±8,3	54,69±3,5
PUFA	18,78±3,1	11,27±3,9	16,26±5,4	17,88±0,5
PUFA N6	6,79±0,8	3,39±1,3	5,69±2,2	7,77±3,3
PUFA N3	11,71±2,2	7,42±2,7	10,46±3,2	10,05±2,7

*média±desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si (Tukey p>0,05). **Fonte:** próprio autor.

DISCUSSÃO

Os lipídios são componentes fundamentais da dieta de peixes visto que fornecem energia, fosfolipídios e ácidos graxos essenciais, além de estarem envolvidos em processos de transportes de vitaminas lipossolúveis e manter a fluidez da membrana plasmática (Watanabe, 1982; Sargent; Tocher; Bell, 2002). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa – LC PUFAs (EPA, DHA e ARA) estão envolvidos nessas funções e, quando fornecidos em quantidades adequadas, melhoram o desempenho produtivo de peixes promovendo melhor crescimento, utilização de alimentos e retenção de proteínas (Asdari *et al.*, 2011; Ayisi *et al.*, 2017; Sarameh *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2021; Kokou *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

Neste estudo com *Astyanax lacustris* verificou-se que a suplementação com óleo de peixe marinho rico em PUFAs-ô3 não influenciou significativamente os parâmetros relacionados ao desempenho produtivo com exceção do ganho de lipídio. Isso demonstra que, a ração formulada foi suficiente para os peixes se desenvolverem adequadamente e que, a energia e os ácidos graxos fornecidos na dieta foram absorvidos e aproveitados sem prejudicar o seu desempenho. Achado que corrobora com outros estudos já realizados em espécies do mesmo gênero nos quais a suplementação da dieta com lipídios não afetou o seu desempenho produtivo (Tavares; 2011; Natori *et al.*, 2016; Chaves *et al.*, 2019).

De acordo com Du *et al.* (2005) as exigências de lipídios na dieta de peixes devem ser atendidas em um nível ótimo, pois o excesso de lipídio prejudica o crescimento, o que não foi observado com os níveis utilizados no presente estudo.

O único parâmetro que foi influenciado significativamente pela inclusão de óleo para *A. lacustris* foi o ganho de lipídio (GL) resultado esperado uma vez que o aumento do teor de lipídios da dieta, conseqüentemente promove uma maior deposição de lipídios, como já demonstrado em outras espécies como *Oplegnathus punctatus* (Wang *et al.*, 2021), *Lateolabrax japonicus* (Xie *et al.*, 2021).

A composição corporal teve apenas os níveis de gordura e cinzas alterados pelo aumento no nível de inclusão de óleo de peixe marinho. O aumento de gordura na composição corporal com a elevação no nível de inclusão de lipídios também é relatado para *Oreochromis niloticus* (Ayisi *et al.*, 2017) e *Oplegnathus punctatus* (Wang *et al.*, 2021). O aumento no teor de gorduras foi compensado pela redução no teor de cinzas, o que também é observado em tilápia do Nilo (El –Kasheif; Saad; Ibrahim, 2011).

Com relação ao perfil de ácidos graxos do músculo após alimentação durante 105 dias, as rações influenciaram na concentração de alguns ácidos graxos, a concentração do ácido esteárico (C18:0) diminuiu em relação a coleta inicial, além disso a inclusão de óleo de peixe até 6% também reduziu os valores deste ácido no músculo. O ácido esteárico (C18:0) é produto de alongamento do palmitato, assim sua composição possivelmente é reflexo da concentração do ácido palmítico da ração (Chepkirui *et al.*, 2021). A concentração do ácido linolênico (C18:3n3, ALA) no músculo dos lambaris diminuíram de acordo com o aumento da inclusão de óleo de peixe marinho mesmo ele estando em maior concentração nas rações com inclusão de óleo, o que difere do já relatado para outras espécies como: *Danio rerio* (Jay-Ram *et al.*, 2008), *Colossoma macropomum* (Paulino *et al.*, 2018) e *Pelteobagrus fulvidraco* (Fei *et al.*, 2020), em que a concentração de ALA do músculo refletiu a composição da dieta ou seja a maior concentração deste ácido na dieta refletiu também em maior concentração no músculo também.

A quantidade de DHA foi maior nos tratamentos com inclusão de óleo de peixe marinho (3% e 9%), o que no caso do tratamento com 9% de OPM é reflexo da alta concentração deste ácido na ração, juntamente com ALA que pode ser convertido em DHA. No entanto, no tratamento com 3% de inclusão de OPM a maior deposição de DHA demonstra a alta eficiência de *A. lacustris* converter ALA em DHA, visto que a quantidade, tanto de ALA, como DHA na dieta com 3% de OPM eram as menores entre os tratamentos com inclusão de óleo. De acordo com Ren *et al.* (2012) os peixes de água doce possuem alta capacidade de converter o ALA em DHA.

Com relação a proporção n6/n3 que é utilizada para avaliar a qualidade nutricional da carne de peixe, e de acordo com Simopoulos (2002) esses valores

não devem ser superiores a 4,0 e segundo a FAO (2014) esse valor deve ser inferior a 5. No presente estudo, o nível de 9% de óleo de peixe marinho foi o único que promoveu aumento na relação n6/n3 na composição do músculo de *A. lacustris* em relação a composição no início do experimento.

O aumento na quantidade de n6/n3 nas fontes proteicas para humanos é importante pois influencia a síntese de LC-PUFAs, os quais estão correlacionados com prevenções de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doença de Alzheimer e depressão, sendo importante ainda para desenvolvimento do cérebro e para saúde materno-infantil (Martin *et al.*, 2006; Shahidi; Ambigaipalan, 2018; Sokoła-Wysoczańska *et al.*, 2018).

Após um ano de alimentação uma quantidade maior de ácidos graxos do músculo foi influenciada pela inclusão de óleo de peixe marinho, sendo que a alimentação por um período prolongado (1 ano) ocasionou a diminuição da porcentagem PUFAs totais, PUFAs-n3 e n6 no músculo de *A. lacustris* em relação ao período de 105 dias, com conseqüente aumento da porcentagem de SAT e MUFA. Já é amplamente comprovado que o perfil de ácidos graxos dos tecidos dos peixes reflete aqueles da sua dieta (Turchini *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2020). E esse padrão se manteve para PUFAs totais e PUFAs-n3 nos tratamentos sem inclusão, 3% e 6% de inclusão de OPM, no entanto para o tratamento com inclusão de 9% de OPM isso não foi observado sendo observado uma diminuição das suas concentrações, apesar deste tratamento ser o que tinha maior quantidade de PUFAs totais e PUFAs-n3 na ração, demonstrando que o reflexo da composição de ácidos graxos da dieta só ocorreu até a inclusão de 6% de óleo, uma inclusão maior (9%) por um período de 1 ano não seguiu o padrão observado para os demais tratamentos. Wang *et al.* (2021) avaliaram a influência de lipídios da dieta sobre a composição lipídica muscular de *Oplegnathus punctatus* e verificaram o mesmo efeito, um aumento do teor PUFAs de acordo com aumento dos lipídios da dieta, com conseqüente diminuição no tratamento com maior quantidade de lipídios, o que poderia ser explicado porque níveis excessivos de lipídios na dieta afetam a retenção e a síntese de LC-PUFA para a espécie.

Em relação ao perfil de ácidos graxos do fígado apenas a porcentagem de SAT foi influenciada pela inclusão de óleo, sendo sua quantidade menor nos

tratamentos com maior da inclusão de óleo de peixe (6 e 9%). Em estudo com tilápia GIFT a alimentação com diferentes níveis de lipídios também resultou em menor teor de SAT de acordo com o aumento dos níveis lipídicos da dieta mesmo em um período de alimentação menor, 90 dias (Ding *et al.*, 2021).

Apesar de não haver diferença entre os tratamentos a porcentagens dos ácidos linolênico (C18:3n3, ALA), estearidônico (C18:4n3), eicosadienóico (C20:2n6) dihomogama-linolênico (C20:3n6), araquidônico (C20:4n6, ARA), eicosapentaenóico (C22:5n3) e quantidade de MUFA seguiram os padrões observados no tecido muscular, com maior concentração da maioria destes ácidos sendo encontrada no tratamento com 6% de OPM. Isto também já observado para *Epinephelus coioides* e *Acanthopagrus schlegelii* em que o perfil de ácidos graxos de ambos os tecidos muscular e hepático seguiam o mesmo padrão, assim como refletiam a composição da dieta (Jin *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2022).

No testículo de *A. lacustris* a porcentagem do ácido gama linolênico (C18:3n6) foi influenciada pela inclusão de óleo, sendo que os tratamentos com maior inclusão (6 e 9%) resultaram em menor concentração deste ácido, em truta arco-íris também foi observado uma redução da concentração desse ácido graxo no testículo de acordo com o aumento de PUFA da dieta (Köprücü; Ozcan, 2019). Já para os ácidos eicosadienóico (C20:2n6) e eicosapentaenóico (C20:5n3, EPA) tiveram efeito contrário, as maiores inclusões (6 e 9%) tiveram maior quantidade destes ácidos. O EPA tem papel importante na reprodução principalmente por estarem envolvidos na síntese de eicosanoides, juntamente com ARA e DHA (Pérez *et al.*, 2007). Além disso em enguias foi verificado que EPA e DHA atuam como moduladores na síntese de andrógenos, a testosterona e 11-cetotestosterona (11-KT), em especial durante a fase final de maturação do esperma, demonstrando a importância de EPA e DHA para reprodução (Baeza *et al.*, 2015).

CONCLUSÕES

Assim, podemos concluir que, a inclusão de até 9% óleo de peixe marinho não influenciou o crescimento de *A. lacustris*, mas contribuiu com a composição de ácidos graxos no músculo, fígado e testículo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, R. P.; KIDA, B. M. S.; PINHEIRO, J. P. S.; OLIVEIRA, L. F.; MARTINEZ, C. B. F.; MOREIRA, R. G. Exposure to aluminum, aluminum+manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. C 215, p. 33-40, 2019.
- ABREU, M. R.; SILVA, L. M. J.; FIGUEIREDO-ARIKI, D. G.; SATO, T. T.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. **Aquaculture Research**, v. 52, p. 471-483, 2021.
- ASDARI, R.; ALIYU-PAIKO, M.; HASHIM, R.; RAMACHANDRAN, S. Effects of diferente dietary lipid souches in the diet for *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) juvenile on growth performance, nutriente utilization, body índices and muscle and liver fatty acid composition. **Aquaculture Nutrition**, v. 1, p. 44-53, 2011.
- ASSIS, C. B.; BRANCOM G. S.; MOREIRA, R. G.; PINHEIRO, J. P. S. Aluminum at environmental concentrations affects the sperm quality of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae*: An in vitro study. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 243, p. 1-8, 2021.
- AYISI, C. L.; ZHAO, J.; RUIPIA, E. J. Growth performance, feed utilization, body and fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing elevated levels of palm oil. **Aquaculture and Fisheries**, v. 2, p. 67-77, 2017.
- BAEZA, R.; PEÑARANDA D. S.; VÍLCHEZ, M. C.; TVEITEN, H.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F. Exploring correlations between sex steroids and fatty acids and their potential roles in the induced maturation of the male European eel. **Aquaculture**, v. 435, p. 328-335, 2015.
- CAMPELO, D. A. V.; OLIVEIRA, K. R. B.; BATISTON, W. P.; ZUANON, J. A. S.; FURUYA, W. M.; MATSUSHITA, M.; SALARO, A. L. Conjugated linoleic acid in diets for (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Bristski, 200). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 788-796, 2015.
- CARNEIRO-LEITE, L.; BASHIYO-SILVA, C.; OLIVEIRA, Y. A. A.; BORGES, L. P.; SANCHEZ, M. P.; SILVA, L. G. D.; LOBATO, S. I. L.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethylsulfoxide and methylglycol. **Neotropical Ichthyology**, v. 18 (3), p. 1-20, 2020.
- CHAVES, W.; ALMEIDA, E. C.; CARNEIRO, C. L. S.; MAGNONE, L.; MARTINS, N. J. T.; BESSONART, M.; ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L. Growth performance of *Astyanax altiparanae* fed with plant and/or animal lipid sources. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 36, p. 63-70, 2019.
- CHEPKIRUI, M.; PS ORINA, P. S.; OPIYO, M.; MUENDO, P.; MBOGO, K.; OMONDI, R. Fatty acids composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

fingerlings fed diets containing different levels of water spinach (*Ipomoea aquatica*). **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 5, p. 100156, 2021.

DING, Z.; LIU, Y.; HAN, J.; LIU, X.; ZHENG, Y.; LI, W.; XU, Y. Dietary lipid supplementation could significantly affect the growth, fatty acid profiles, and expression of ppar α , leptin, and adiponectin genes in juvenile genetically improved farmed tilapia. **European Journal of Lipid Science and Technology**, V. 123, P. 1-13, 2021.

DU, Z. Y.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; WANG, J. T.; WANG, Y.; LIANG, G. Y. Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 139-146, 2005.

EL-KASHEIF, M. A.; SAAD, A. S.; IBRAHIM, S. A. Effects of varying levels of fish oil on growth performance, body composition and haematological characteristics of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L). **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 15, p. 125-141, 2011.

FEI, S.; LIU, C.; XIA, Y.; LIU, H.; HAN, D.; JIN, J.; YANG, Y.; ZHU, X.; XIE, S. The effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth performance, tissues fatty acid profile and sex steroid hormone synthesis of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100361, 2020.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B. A.; VALENTI, W.C. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, p. 2-16, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of food insecurity in the world. Strengthening the enabling environment for food security and nutrition International Fund for Agricultural Development. World Food Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014.

GUO, H.; CHEN, C.; YAN, X.; LI, Y.; WEN, X.; YOU, C.; MONROIG, O.; TOCHER, D. R.; WANG, S. Effects of different dietary oil sources on growth performance, antioxidant capacity and lipid deposition of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. **Aquaculture**, v. 530, p. 1-12, 2021.

HOUSTON, S. J. S.; KARALAZOS, V.; TINSLEY, J.; BETANCOR, M. B.; MARTIN, S. A. M.; TOCHER, D. R.; MONROIG, O. The compositional and metabolic responses of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to a gradient of dietary fish oil and associated n-3 long-chain PUFA content. **British Journal of Nutrition**, v. 118, p. 1010-1022, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal**. Brasília, 2021.

JAYA-RAM, A.; KUAH, M.; LIM, P.; KOLKOVSKI, S.; SHU-CHIEN, A. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 277 (3-4), p. 275-281, 2008.

JIN, M.; LU, Y.; YUAN, Y.; LI, Y.; QIU, H.; SUN, P.; MA, H. N.; DING, L. Y.; ZHOU, Q. C. Regulation of growth, antioxidant capacity, fatty acid profiles,

hematological characteristics and expression of lipid related genes by different dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). **Aquaculture**, v. 471, p. 55-65, 2017.

KOKOU, F.; VASILAKI, A.; NIKOLOUDDAKI, C.; SARI, A. B.; KARALAZOS, V.; FOUNTOULAKI, E. Growth performance and fatty acid tissue profile in gilthead seabream juveniles fed with different phospholipid sources supplemented in low-fish meal diets. **Aquaculture**, v. 544, p. 112, 2021.

KÖPRÜCÜ, K.; ÖZCAN, S. Fatty acid, fat-soluble vitamin and sterol contents in testis and semen, testis-somatic index and spermatologic values of broodstock rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with different levels of omega-3 fatty acids under regular stripping conditions. **Aquaculture Research**, v. 50, p. 2477–2485, 2019.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 106-169, 2003.

LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R. Y.; SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S. R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, p. 1-10, 2018.

LUCENA, C. A.; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 1, p. 101-125, 2016.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19 (6), p. 761-770, 2006.

MERÇON, J.; CABRAL, D. S.; TEIXEIRA, B. C.; PEREIRA, T. M.; BONA, A. M.; ARMINI, C. V. L.; AGOSTINHO, S. G. N.; VASCONCELOS, C. M.; GOMES, L. C. Seasonality effects on the metal concentration and biochemical changes in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from Doce River after the collapse of the Fundão dam in Mariana, Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 1-8, 2022.

NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L. H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, 163-171, 2017.

NATORI, M. M.; ALVES, R. C. P.; OLIVEIRA, R. H. F.; SEGURA, J. G.; VIEGAS, E. M. M. Sesame oil in diets for lambari: Effects on growth parameters, corporal chemical composition and physiological alterations. **Ciência Animal**, v. 46, p. 1274-1280, 2016.

OLIVEIRA, K. R. B.; CAMPELO, D. A. V.; BATISTON, W. P.; FURUYA, W. M.; ZUANON, J. A. S.; CARNEIRO, A. P. S.; FERRAZ, R. B.; SALARO, A. L. Effect of conjugated linoleic acid feeding periods on fatty acid profile and nutritional quality of *Astyanax altiparanae*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, p. 1-10, 2021.

PAULINO, R. R.; PEREIRA, R. T.; FONTES, T. V.; OLIVA-TELES, A.; PERES, H.; CARNEIRO, D. J.; ROSA, P. V. Optimal dietary linoleic acid to linolenic acid ratio improved fatty acid profile of the juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 488, p. 9-16, 2018.

PARRISH, C. C.; NICHOLS, P. D.; PETHYBRIDGE, H.; YOUNG, J. W. Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator connections. **Oecologia**, v. 177, p. 85-95, 2015.

PÉREZ, M. J.; RODRÍGUEZ, C.; CEJAS, J. R.; MARTÍN, M. V.; JEREZ, S.; LORENZO, A. Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 146, p. 187-196, 2007.

PINHEIRO, J. P. S.; LIMA, J.; ASSIS, C. B.; BRANCO, G. S.; GOMES, A. D.; MOREIRA, R. G. Paternal exposure to aluminum, acidity, and temperature affect fatty acid seminal profile, embryonic and larval development of *Astyanax altiparanae*. **Chemosphere**, v. 266, p. 1-11, 2021.

QIN, Y.; HE, L.; LI, Y. W. D.; CHEN, W.; YE, J. Growth performance, fatty acid composition, and lipid metabolism are altered in groupers (*Epinephelus coioides*) by dietary fish oil replacement with palm oil. **Animal Nutrition**, v. 8, p. 102-113, 2022.

QUIRINO, P. P.; RODRIGUES, M. S.; CABRAL, M. S.; SIQUEIRA-SILVA, D.; MORI, R. H.; BUTZGE, A. J.; NÓBREGA, R. H.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The influence of increased water temperature on the duration of spermatogenesis in a neotropical fish, *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 747-755, 2021.

REN, H.; YU, J.; XU, P.; TANG, Y. Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression. levels of $\Delta 6$ desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 163, p. 184-192, 2012.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo amarelo em Monte Castelo/ SP: um estudo de caso. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 3, p.307-315, 2011.

SARAMEH, S. P.; BAHRI, A. H.; FALAHATKAR, B.; YARMOHAMMADI, M.; SALARZADEH, A. The effect of fish and rapeseed oils on growth performance, egg fatty acid composition and offspring quality of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, p. 543-554, 2019.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. **The lipids**. In: Fish Nutrition, 3rd edn (ed. by J.E. Halver & R.W. Hardy), pp. 181– 257. Academic Press, San Diego, 2002.

SARGENT, J.; McEVOY, L.; ESTEVEZ, A.; BELL, G.; BELL, M.; HENDERSON, J.; TOCHER, D. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, v. 179, p. 217-229, 1999.

SATTANG, S.; AMORNLERDPISON, D.; TONGSIRI, S.; PALIC, D.; MENGUMPHAN, K. Effect of freshwater fish oil feed supplementation on the reproductive condition and production parameters of hybrid catfish (*Pangasius larnaudii* x *Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage, 1878) broodstock. **Aquaculture Reports**, v. 20, p. 1-7, 2021.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefit. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 345-381, 2018.

SHAHKAR, E.; YUN, H.; LEE, S.; KIM, D. J.; KIM, S. K.; LEE, B. I.; BAI, S. C. Evaluation of the optimum dietary arachidonic acid level and its essentiality based on growth and non-specific immune responses in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Aquaculture**, v. 452, p. 209-216, 2016.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. UFV, Viçosa, p. 235, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, E.; WYSOCZANSKI, T.; WAGNER, J.; CZUZ, K.; BODKOWSKI, R.; LOCHYNSKI, S.; PATKOWSKA-SOKOLA, B. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders: review. **Nutrients**, v. 10, p. 1-21, 2018.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, V. 6, P. 63-71, 2007.

TAN, P.; WABIKE, E. E.; QIN, G.; LOU, B.; XU, D.; CHEN, R.; WANG, L. Effects of dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFAs) on growth performance, body composition and subcutaneous adipose tissue transcriptome analysis of juvenile yellow drum (*Nibea albiflora*). **Aquaculture Nutrition**, v. 27, p. 556-567, 2020.

TAVARES, M. M. **Fontes de óleos vegetais em dietas para lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*): desempenho produtivo, perfil de ácidos graxos, rendimento e composição de carcaça**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Lavras, Viçosa, 2011.

TOCHER, D. R. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 12, p. 107-184, 2003.

TURCHINI, G.; TORSTENSEN, B. E.; NG, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, V. 1, P. 10-57, 2009.

VIDOTTO-MAGNONI, A. P.; KURCHEVSKI, G.; LIMA, F. P.; NOBILE, A. B.; GARCIA, D. A. Z.; CASIMIRO, A. C. R.; PEREIRA, A. D.; ORSI, M. L. Population biology of *Astyanax lacustris* (Pisces, Characiformes) in a Neotropical reservoir and its tributaries. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1-14, 2021.

WANG, J.; LIU, T.; ZHENG, P.; XU, H.; SU, H.; HAN, T.; YANG, Y. Effect of dietary lipid levels on growth performance, body composition, and feed utilization of juvenile spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. **Aquaculture Reports**, v. 21, p. 1-9, 2021.

WATANABE, T. Lipid nutrition in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 73B, p. 3-15, 1982.

XIE, S.; LIN, Y. WU, T.; TIAN, L.; LIANG, J.; TAN, B. Dietary lipid levels affected growth performance, lipid accumulation, inflammatory response and apoptosis of japanese seabass (*lateolabrax japonicus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 27, p. 907-916, 2021.

XU, H.; TURCHINI, G. M.; FRANCIS, D. S.; LIANG, M.; MOCK, T. S. ROMBENSO, A.; AI, Q. Are fish what they eat? A fatty acid's perspec. **Progress in Lipid Research**, v. 80, p. 101064, 2020.

XU, H.; WANG, J.; MAI, K.; XU, W.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; AI, Q. Dietary docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) ratio influenced growth performance, immune response, stress resistance and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 741-757, 2016.

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

ZÁRATE, R.; JABER-VAZDEKLS, N.; TEJERA, N.; PÉREZ, J. A.; RODRÍGUEZ, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, p. 1-19, 2017

5. CAPÍTULO II

Efeito da suplementação dietética de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na qualidade do sêmen de *Astyanax lacustris*

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da inclusão de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PUFAs- ω 3) na dieta de machos de *Astyanax lacustris*, sobre a qualidade seminal. Para tal, 400 machos foram dispostos em 20 caixas de 180 L em sistema de recirculação. Os peixes receberam dietas isoproteicas (32% PB) contendo 0, 3, 6 e 9% de inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) durante 105 dias. Após este período os machos foram induzidos hormonalmente à espermição e o sêmen coletado após 226 horas/grau. Os parâmetros avaliados foram osmolalidade, volume e coloração seminal, concentração, morfologia, motilidade espermática, integridade da membrana e parâmetros cinéticos espermáticos: motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea, linear e média, coeficientes de linearidade e de retilinearidade, oscilação da trajetória, amplitude de deslocamento lateral da cabeça e frequência de batimento cruzado. A coloração seminal variou de esbranquiçado a amarelado. O volume seminal foi maior nos tratamentos sem inclusão de óleo de OPM e 3% de OPM. A inclusão de PUFAs- ω 3 influenciou positivamente nos parâmetros cinéticos, sendo que os tratamentos com 6% e 9% de OPM resultaram em maiores valores para a maioria destes parâmetros, não diferindo estatisticamente entre si. Assim conclui-se que, a adição PUFAs- ω 3 na alimentação de reprodutores melhorou significativamente a qualidade seminal dos machos de *Astyanax lacustris*.

Palavras-chave: óleo de peixe marinho, reprodução, espermatozoides de peixe, lambari-do-rabo-amarelo

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of including omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs- ω 3) in the diet of *Astyanax lacustris* males on seminal quality. For this, 400 fish were arranged in 20 boxes of 180 L in the recirculation system. Fish received isoprotein diets (32% CP) containing 0, 3, 6 and 9% inclusion of marine fish oil (OPM) for 105 days. After this period, males were hormonally induced to sperm, and semen was collected after 226 h/degree. The parameters evaluated were osmolality, seminal volume and color, concentration, morphology, sperm motility, membrane integrity, and sperm kinetic parameters: total and progressive motility, velocity curvilinear linearity and average, linearity and rectilinearity, coefficients of trajectory oscillation, head lateral displacement amplitude, and cross-beat frequency. Seminal color ranged from off-white to yellowish. Seminal volume was greater in treatments without inclusion of OPM oil and 3% OPM. The inclusion of PUFAs- ω 3 positively influenced the kinetic parameters, with treatments with 6% and 9% OPM resulting in higher values for most of these parameters, not statistically different from each other. Thus, it is concluded that the addition of PUFAs- ω 3 to the feed of breeders significantly improved the seminal quality of *A. lacustris* males.

Keywords: marine fish oil; reproduction; fish sperm; yellowtail lambari

INTRODUÇÃO

O sucesso da reprodução de peixes em sistemas de produção intensivo é dependente da qualidade dos gametas. Entende-se por gametas de alta qualidade aqueles que estão estruturalmente bem formados, possuindo capacidade de fertilização e de geração de descendentes viáveis (Valdebenito Gallegos; Effer, 2013). Em sistemas intensivos de produção a produção desses gametas pode ser controlada por fatores ambientais como: fotoperíodo, temperatura da água ou substrato de desova, além disso as condições nutricionais e fisiológicas dos reprodutores em especial, tem efeito direto na qualidade dos gametas e conseqüentemente no desempenho reprodutivo dos peixes (Bobe; Labbé, 2010; Mylonas; Fostier; Zanuy, 2010; Mylonas; Ducan; Asturiano, 2017).

Diversos estudos (Izquierdo, Fernandez-Palacios, Tacon, 2001; Watanabe e Vassallo-Agius, 2003; Ling *et al.*, 2006; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Norambuena *et al.*, 2012) demonstram que a nutrição influencia nos parâmetros reprodutivos tais como, o desenvolvimento gonadal, a quantidade e qualidade dos oócitos e espermatozoides e a qualidade das larvas produzidas, uma vez que a disponibilidade dos componentes bioquímicos essenciais para a gametogênese e o controle da reprodução podem ser afetados pelo estado nutricional dos reprodutores (Izquierdo; Fernandez-Palacios; Tacon, 2001; Norambuena *et al.*, 2012).

E um dos principais fatores nutricionais que afetam significativamente o desempenho reprodutivo em peixes é o teor de ácidos graxos essenciais (AGES) da dieta (Watanabe *et al.*, 1984). Os lipídios, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), que incluem o ácido araquidônico (20: 4 n-6, AA), ácido eicosapentaenóico (20: 5 n-3, EPA) e ácido docosahexaenóico (22: 6 n-3, DHA), são necessários à dieta, pois são precursores de eicosanóides que estão envolvidos na produção de esteroides, desenvolvimento gonadal e manutenção da integridade da membrana (Jaya-Ram *et al.*, 2008).

LC-PUFA também são importantes para outras funções, como o controle da reprodução e do desenvolvimento de embriões e/ou larvas de peixes, além

de melhorar a qualidade dos espermatozoides (Izquierdo; Fernandez-Palacios; Tacon, 2001; Norambuena *et al.*, 2012). Os LC-PUFAs também podem ser sintetizados a partir dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), o ácido linolênico (18: 3 ω -3, ALA) e o ácido linoléico (18: 2 ω -6, LA), também conhecidos como ômega-3 e ômega-6, respectivamente. Esses ácidos graxos são considerados AGES, devido à incapacidade dos peixes em sintetizá-los no corpo, e devem ser fornecidos na dieta (Izquierdo; Fernandez-Palacios; Tacon, 2001; Norambuena *et al.*, 2012).

Os efeitos positivos da adição de lipídios na dieta sobre aspectos da reprodução de peixes, seja na melhoria de qualidade do sêmen e dos oócitos, ou no aumento da taxa de fecundidade, da taxa de eclosão e na sobrevivência das larvas, já foi relatada para várias espécies como: *Danio rerio* (Jaya-Ram *et al.*, 2008), *Oreochromis niloticus* (Ng; Wang, 2011), *Colisa fasciatus* (Hossen *et al.*, 2014), *Acipenser baerii* (Luo *et al.*, 2017), *Oncorhynchus mykiss* (Hajjahmadian; Moghanlou; Ardabili, 2016), *Sparus aurata* (Ferozekhan *et al.*, 2021) e *Cyprinus carpio* var. *koi* (Harshavardhan *et al.*, 2021).

É notório a importância dos gametas de alta qualidade para o sucesso reprodutivo em cativeiro, sendo a avaliação das características seminais é rotina imprescindível na reprodução artificial para qualquer espécie. Para descrição de um perfil espermático, são analisados vários parâmetros relacionados as características seminais, como: volume seminal, taxa e duração da motilidade espermática, morfologia e concentração dos espermatozoides, etc. (Murgas *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

Ao longo dos anos, o conhecimento da fisiologia da reprodução, juntamente com os inúmeros estudos de biologia de peixes, permitiu a determinação de procedimentos de manejo que permitem a indução da maturação gonadal dos peixes em sistema intensivos de produção e, conseqüentemente, a fertilização artificial dos oócitos, viabilizando a produção de peixes em grande escala, e o aumento da indústria da piscicultura (Zaniboni-Filho; Weingartner, 2007).

O lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax lacustris* (Garutti e Britski, 2000), é uma espécie rústica, de pequeno porte, com ciclo de vida rápido e que apresenta

elevada produtividade em cultivo intensivo, devido a sua facilidade de manejo, aceitação de alimentação artificial e alta prolificidade, sendo por isso considerada uma espécie modelo, além de apresentar grande importância econômica no mercado de isca vivas e para consumo humano (Sabbag *et al.*, 2011; Fonseca; Costa-Pierce; Valenti, 2017; Brambila-Souza *et al.*, 2021)

Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar se a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PUFAs-ô3) na alimentação de *Astyanax lacustris*, influencia na qualidade seminal dos reprodutores da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, no Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO). Todos os procedimentos técnicos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira no processo CEUA- 12/2019 FEIS/UNESP.

Dietas experimentais

Foram formuladas 4 dietas isoproteicas distintas (32% PB) (Tabela 1) com três níveis de inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) purificado contendo altos níveis de PUFA- ω 3 (3, 6 e 9% na dieta) e um dieta controle sem inclusão de óleo (0%), totalizando quatro tratamentos. Para o preparo das dietas, os ingredientes foram triturados, misturados, umedecidos e processados em extrusora Exteec, modelo Ex Micro, com matriz de 3 mm. Antes do processamento da ração, as mesmas foram submetidas à análises bromatológicas (Laboratório de Bromatologia, UNESP, Campus de Ilha Solteira) (Tabela 1), bem como análise do perfil de ácidos graxos do óleo de peixe marinho e das quatro dietas (Laboratório de Estudos de Fisiologia Animal, UNESP, Campus Ilha Solteira e Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, USP/ Campus São Paulo) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Ingredientes e composição centesimal de dietas experimentais para reprodutores de *Astyanax lacustris* (valores expressos em % da matéria natural).

Ingredientes (%)	Dietas experimentais (%)			
	0	3	6	9
Farelo de soja	31,00	32,00	32,00	32,50
Milho	22,27	24,37	17,97	14,00
Quirera de arroz	16,00	10,90	14,00	12,70
Farinha de peixe (tilápia)	15,00	15,00	15,30	15,00
Glúten de milho	7,00	7,00	7,00	7,00
Farelo de trigo	6,00	5,00	5,00	7,22
Óleo de peixe marinho	0,00	3,00	6,00	9,00
Fosfato bicálcio	1,50	1,50	1,45	1,40
Calcário	0,40	0,40	0,45	0,35
Premix ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT, antioxidante	0,30	0,30	0,30	0,30
Antifúngico (Filax)	0,03	0,03	0,03	0,03
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
Calculada²				
Matéria Seca (%)	91,54	91,88	92,06	92,29
Proteína Bruta (%)	32,00	32,00	32,00	32,00
Extrato Etéreo (%)	3,11	6,11	8,96	11,84
Matéria Mineral (%)	7,12	7,15	7,15	7,17
Fibra Bruta (%)	2,84	2,77	2,69	2,90
Extrato Não Nitrogenado ³ (%)	44,09	41,47	38,89	36,15
Energia Bruta (kcal/kg)	3,965	4,136	4,293	4,464
Cálcio	1,50	1,50	1,53	1,46
Fósforo	0,75	0,75	0,75	0,73
Lisina	1,90	1,91	1,92	1,92
Metionina	0,67	0,66	0,66	0,65

(¹) Mineral mix (Premix Raguife; Santa fé do Sul. SP. Brasil) por 5 Kg por tonelada: Fe 20,00 g/kg; Cu 3.500,00 mg/kg; Zn 24,00 g/kg; I 160,00 mg/kg; Mn 10,00 mg/kg; Se 100,00 mg/kg; Co 80,00 mg/kg; vitamina A 2.400.000,00 UI/kg; vitamina D3 600.000,00 UI/kg; vitamina E 30.000,00 UI/kg; vitamina K3 3.000,00 mg/kg; vitamina C 60,00 g/kg; vitamina B1 4.000,00 mg/kg; vitamina B2 4.000,00 mg/kg; vitamina B6 3.500,00 mg/kg; vitamina B12 8.000,00 mcg/kg; inositol 25,00 g/kg; colina 100,00 g/kg; Ac pantotênico 10,00 g/kg; biotina 200,00 mg/kg; Ac. Fólico 1.200,00 mg/kg; niacina 20,00 g/kg; antioxidante *etc 5.000,00 mg/kg. (²) Com base na análise da composição dos ingredientes. (³) Extrato isento de nitrogênio (NFE) = matéria seca - (proteína bruta + lipídeo + matéria mineral + fibra bruta). **Fonte:** próprio autor.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) de óleo de peixe marinho utilizado na composição de dietas experimentais para reprodutores de *Astyanax lacustris*.

Ácidos graxos	Óleo de peixe
C18:0	0,78
C18:1	1,12
C18:2n6	4,41
C18:3n3	31,92
C20:4n3	7,95
C20:5n3	8,98
C22:5n3	35,29
C22:6n3	9,54

Fonte: próprio autor.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (%) detectado nas quatro dietas fornecidas aos reprodutores *Astyanax lacustris*.

Ácidos Graxos (%)	Dietas experimentais (%)			
	0	3	6	9
C14:0	1,65	1,54	1,67	1,94
C16:0	20,00	16,95	8,87	9,41
C16:1	3,04	2,92	4,50	3,34
C18:0	3,85	4,25	5,02	4,43
C18:1	31,42	6,32	6,68	5,74
C18:2n6 (LA)	34,36	16,38	7,82	7,10
C18:3n3 (ALA)	0,28	2,15	3,17	2,30
C18:3n6	1,82	7,41	4,50	1,16
C18:4n3	0,72	4,28	6,09	4,50
C20:2n6	0,00	1,56	0,35	0,96
C20:3n6	0,30	4,14	3,74	4,51
C20:4n6 (ARA)	0,66	8,14	7,66	5,07
C20:5n3 (EPA)	0,72	8,96	11,40	18,80
C22:5n3	0,14	1,71	1,91	2,39
C22:6n3 (DHA)	1,20	13,25	27,24	27,37
SAT	25,50	22,74	15,56	15,78
MUFA	34,47	9,24	11,18	9,08
PUFA	40,18	67,99	73,88	74,16
PUFAn6	37,13	37,64	24,07	18,80
PUFAn3	3,05	30,35	49,81	55,36

Fonte: próprio autor.

Delineamento experimental

Foram utilizados 400 machos de *A. lacustris*, com peso médio de $2,08 \pm 0,44$ g e comprimento total médio de $5,4 \pm 0,39$ cm. Estes foram distribuídos em 20 caixas de polietileno de 180 L dispostas em um sistema de recirculação, com uma densidade de 20 peixes por caixa.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Os tratamentos foram compostos por quatro níveis inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) rico em PUFA- ω 3: 0 - ração sem inclusão de PUFA- ω 3 (0% de OPM); 3 - ração com inclusão de 3% de PUFA- ω 3 (3% de OPM); 6 - ração com inclusão de 6% de PUFA- ω 3 (6% de OPM) e; 9 - ração com inclusão de 9% de PUFA- ω 3 (9% de OPM). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9h e 17h) até a saciedade aparente durante 105 dias. Durante todo período experimental foram monitoradas seguintes variáveis físico-químicas da água dos quatro tratamentos: pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica medidas todo dia em dois períodos pela manhã e à tarde por meio de medidor multiparâmetros (ASKO - AK88v2). E a amônia total e nitrito foram mensurados três vezes na semana, utilizando o Kit Testes Alcon Labcon (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis de qualidade de água registradas durante o período experimental de 105 dias.

Variáveis	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
Temperatura (°C)	28,5 \pm 2,01	28,4 \pm 1,91	28,6 \pm 1,97	28,5 \pm 1,96
pH	7,9 \pm 0,36	7,8 \pm 0,33	7,7 \pm 0,32	7,8 \pm 0,27
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	4,9 \pm 2,50	5,2 \pm 2,44	5,6 \pm 1,13	4,9 \pm 2,31
Amônia total (ppm)	0	0	0	0
Condutividade elétrica (μ S cm ⁻¹)	334 \pm 61,31	321 \pm 27,50	328 \pm 17,06	336 \pm 31,78
Nitrito (μ g L ⁻¹)	0	0	0	0

Fonte: próprio autor.

Coleta do sêmen

Após o período de 105 dias, os machos de *A. lacustris* foram induzidos hormonalmente, utilizando Ovopel[®] (GnRh – análogo + Dopamina) em dosagem única (3mg/kg de peixe vivo) (Yasui *et al.*, 2015). Após 226 unidades térmicas acumuladas (226 UTAs), (Carneiro-Leite *et al.*, 2020) os machos foram sedados com solução de benzocaína a 1% (SIGMA – ALDRICH E1501), sendo o sêmen extrusado por meio de massagem abdominal no sentido anteroposterior do corpo, e coletado com auxílio de micropipetas de 10 - 100µl (KASVI-K1-100B), evitando a contaminação com fezes, urina ou sangue.

Análise do sêmen

Para verificar a influência da inclusão do óleo de peixe marinho sobre a qualidade do sêmen de *A. lacustris* foram analisados os seguintes parâmetros: coloração e viscosidade seminal, duração da motilidade, considerando desde a ativação dos espermatozoides até a observação de 10% dos espermatozoides móveis; volume seminal, considerando até o momento de parada da ejaculação ou de observação de contaminação com sangue; concentração espermática (espermatozoides/mL), mensurada por meio da Câmara Hematimétrica de Neubauer, para isso o sêmen foi diluído em solução formol-salina na proporção de 1:1000, respectivamente (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006). Também foi determinada a osmolalidade do plasma seminal, para isto o sêmen foi centrifugado a 3.000 rpm, durante 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado e analisado em osmômetro (OSMOMAT[®] model 030, Berlim, Alemanha).

Os parâmetros de motilidade foram avaliados usando um sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (ISAS[®] Integrated Semen Analysis System, Proiser, Valência, Espanha) acoplado a um microscópio de contraste de fase UB200i (UOP/Proiser) com uma objetiva de contraste de fase negativa 10x. As imagens foram capturadas com câmera ISAS 782C (Proiser, Espanha) e processadas com software CASA usando 50 frames por segundo (fps). O sêmen foi ativado pela adição 30µl de água destilada à 0,5µl de sêmen em uma câmera Makler[™] (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel), e análise realizada após 10s de ativação. Foram avaliados a motilidade total (MOT, %), motilidade progressiva (PRG, %), espermatozoides rápidos (SptzRápido, %), velocidade curvilínea

(VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), coeficiente de retilinearidade (STR, %), oscilação média da trajetória espacial (WOB, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz). Espermatozoides com VAP < 10 $\mu\text{m/s}$ foram considerados imóveis, com > 25 $\mu\text{m/s}$ médios e > 50 $\mu\text{m/s}$ rápidos. Todas as análises foram realizadas para os quatro tratamentos 0%, 3%, 6% e 9%.

A integridade da membrana espermática foi medida pelo método de coloração eosina-nigrosina, para esta análise os espermatozoides foram corados na proporção 1:10:10 (sêmen:eosina:nigrosina), sendo considerados vivos quando permaneciam incolores, indicando membrana íntegra; ou mortos, quando corados de rosa, indicando membrana rompida de acordo com Lopes *et al.* (2018). Foram utilizados cinco animais por caixa/tratamento e contados 200 espermatozoides por peixe utilizando um microscópio de luz (Olympus CX41) em aumento de 40X.

Além das análises citadas acima, também foi avaliada a normalidade morfológica dos espermatozoides. Para isso, o sêmen de cinco animais por tratamento foi fixado em solução formol-salina proporção de 1:1000 (sêmen:fixador), corados com rosa bengala, na proporção de 1:10 (corante: sêmen) e após, 10 μl foi depositado em uma lâmina de vidro e cobertos com lamínula (Streit-Junior *et al.*, 2008). Em cada lâmina foram analisados 100 espermatozoides, sendo a análise realizada sob microscopia ótica (Zeiss/AXIOCAM-MRc5), em ampliação de 1000X. Os espermatozoides foram classificados em normais ou danificados, sendo os danos classificados apenas em alterações primárias (macrocefalia, microcefalia, degeneração na cabeça e na peça intermediária, cauda fraturada, coto da cauda e cauda fortemente enrolada) e secundárias (cabeça normal livre, cauda dobrada simples, gota proximal e distal) de acordo com Miliorini *et al.* (2011).

Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade dos erros e homoscedasticidade. A análise de variância ($p < 0,05$) foi aplicada aos dados, sendo aplicado o teste de Tukey para os dados paramétricos e o teste de

Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico R Studio.

RESULTADOS

O sêmen apresentou coloração esbranquiçada a amarelada e aspecto levemente viscoso, independente do tratamento considerado. Com relação ao parâmetro de volume seminal os tratamentos com 6 e 9% de inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) proporcionaram a obtenção do menor volume de sêmen. Para o tempo de motilidade espermática o tratamento com 9% de OPM apresentou valor ($36,4 \pm 4,0$ s) significativamente menor em comparação com 6% de OPM ($45,1 \pm 7,4$ s) (Tabela 5). Para a osmolalidade seminal, concentração espermática e integridade de membrana, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros seminais de lambaris alimentados com a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PUFAs- ω 3) em sua dieta, pelo período de 105 dias.

Parâmetros	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
Volume Seminal (μ l)	$42,5 \pm 32,1$ A*	$40,2 \pm 18,3$ A	$25,5 \pm 14,0$ AB	$23 \pm 14,8$ B
Tempo de Motilidade (s)	$40,3 \pm 7,1$ AB	$41,3 \pm 6,0$ AB	$45,1 \pm 7,4$ A	$36,4 \pm 4,0$ B
Osmolalidade (mOsm)	$300 \pm 0,01$	$286 \pm 0,007$	$277 \pm 0,01$	$290 \pm 0,005$
Concentração espermática (sptz/mL)	$11,5 \pm 5,3 \times 10^9$	$10,3 \pm 3,9 \times 10^9$	$10,7 \pm 3,1 \times 10^9$	$11,4 \pm 4,5 \times 10^9$
Integridade de Membrana (%)	$94,6 \pm 11,1$	$98,2 \pm 1,9$	$99 \pm 2,2$	$99,2 \pm 1,4$

Médias seguidas com letras diferentes na linha diferem estatisticamente (Kruskal-Wallis $p < 0,05$). Fonte: próprio autor. **Fonte:** próprio autor.

Não foi encontrada diferença significativa para a porcentagem de alterações morfológicas primárias e secundária (Tabela 6).

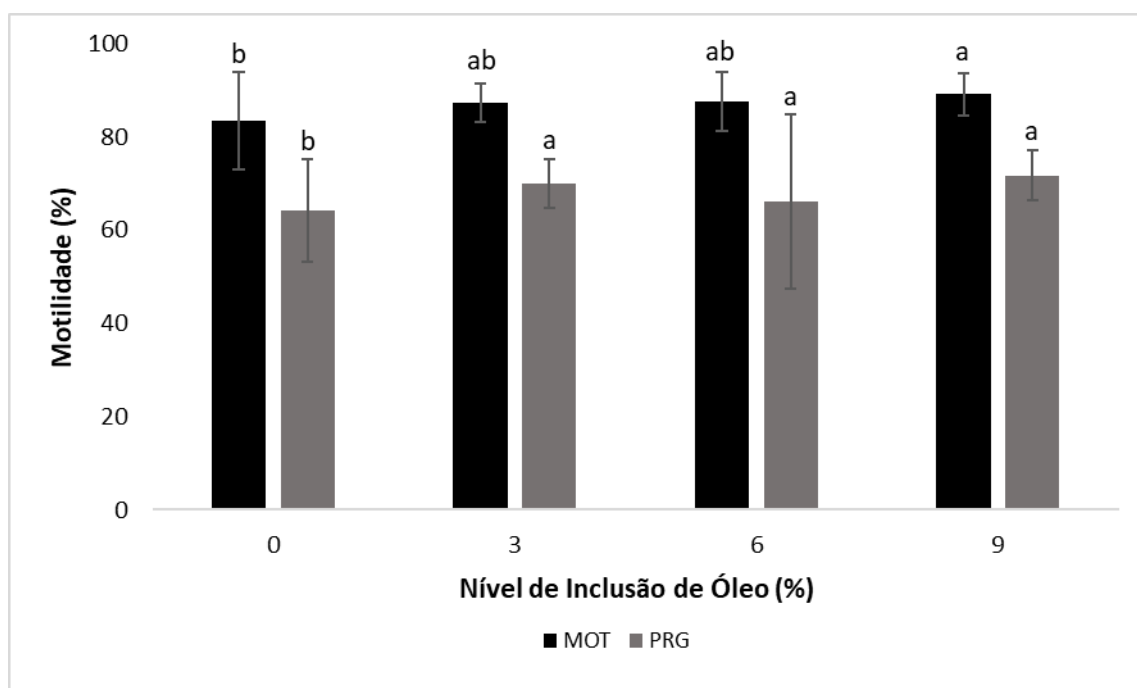
Tabela 6. Análise da normalidade morfológica dos espermatozoides do sêmen fresco de *Astyanax lacustris* alimentado com a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PUFAs-ô3) em sua dieta, pelo período de 105 dias.

	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
Alterações primárias (%)	44,6±20,5	32±6,7	32,6±9,3	38,6±10,7
Alterações secundárias (%)	19,4±3,8	14,4±6,8	10,6±4,6	13,4±12,7
Defeitos Totais (%)	64±11,6	47,8±8,7	43,2±7,3	52±6,8
Normal (%)	36±12,7	52,2±9,2	56,8±8,7	48±15,8

Fonte: próprio autor.

Para os parâmetros de motilidade total (MOT) e progressiva (PRG) observou-se aumento significativo com a inclusão de PUFAs-ô3 com destaque para o tratamento com 9% de inclusão OPM que apresentou valores maiores (89,14±4,5% e 71,69±5,3%) que diferiram significativamente nesses dois parâmetros do tratamento sem inclusão de OPM (83,43±10,3% e 64,26±10,9%) (Figura 1 e Tabela 7).

Figura 1. Resultados obtidos para motilidade espermática total (MOT, %) e progressiva (PRG, %) após a aplicação da alimentação com a inclusão PUFAs-ô3 na dieta de *Astyanax lacustris* pelo período de 105 dias.



Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, p<0,05). Fonte: próprio autor.

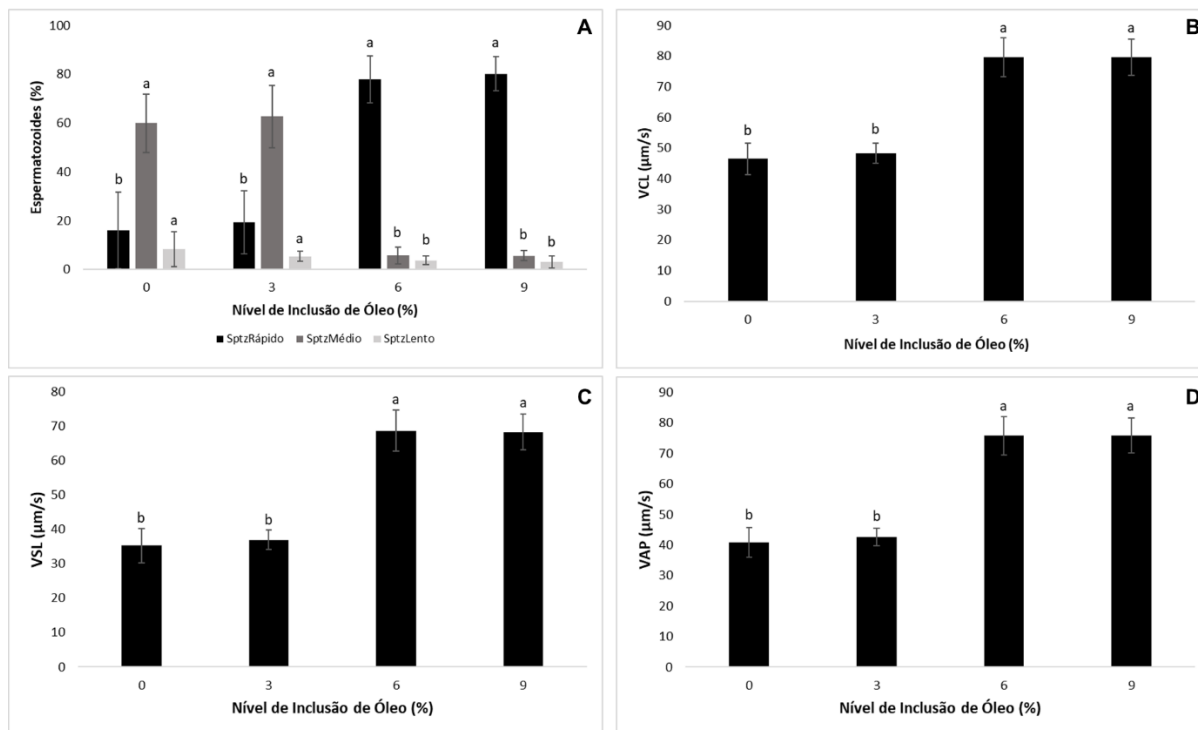
Tabela 7: Variação dos parâmetros cinéticos espermáticos de reprodutores tratados com óleo de peixe marinho em relação ao controle.

Níveis de Inclusão de Óleo (%)	0		3		6		9	
Parâmetros cinéticos	Total	Total	I (%)	Total	I (%)	Total	I (%)	
MOT (%)	83,43	87,26	4,59	87,5	4,88	89,14	6,84	
PRG (%)	64,26	69,92	8,81	66,02	2,74	71,69	11,56	
SptzRápido. (%)	15,93	19,20	20,53	77,94	389,27	80,21	403,52	
VCL (µm/s)	46,46	48,25	3,85	79,58	71,29	79,64	71,42	
VSL (µm/s)	35,28	36,90	4,59	79,58	125,57	68,23	93,40	
VAP (µm/s)	34,97	42,62	21,88	68,62	96,23	75,80	116,76	

Legenda: Motilidade total - MOT; Motilidade progressiva – PRG; Espermatozoide rápido - SptzRápido; Velocidade curvilínea - VCL; Velocidade linear - VSL; Velocidade média – VAP; I - Aumento percentual em comparação com o controle. **Fonte:** próprio autor.

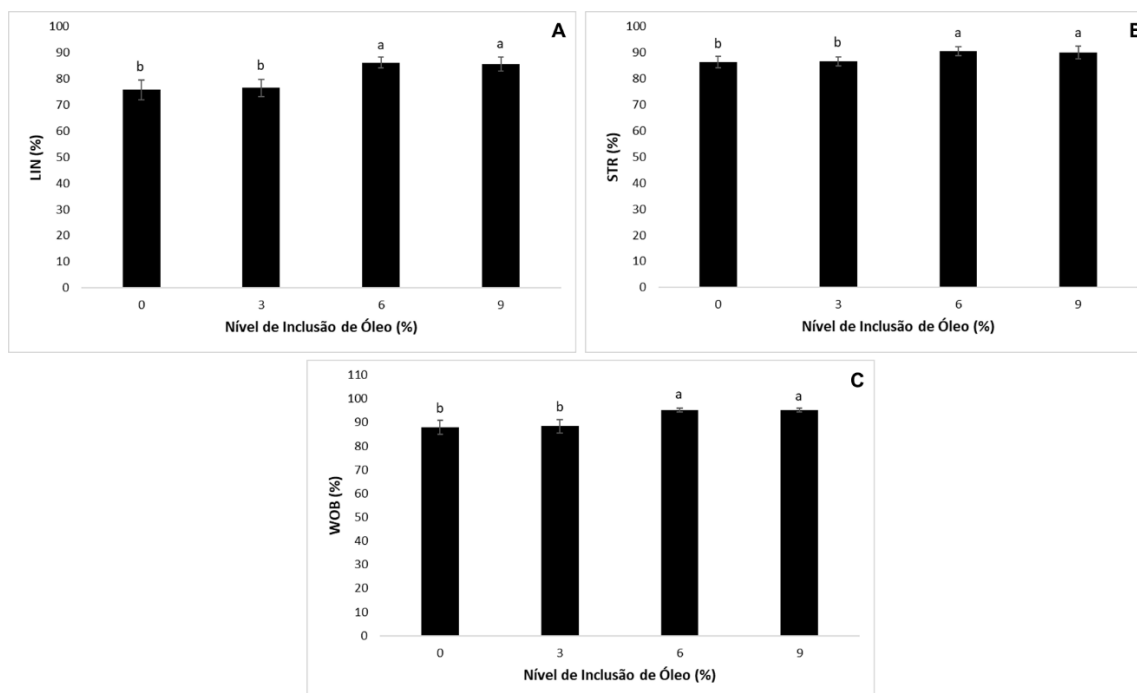
Para os parâmetros VCL, VSL, VAP, número de espermatozoides rápidos, LIN, STR, e WOB os tratamentos com 6% e 9% de OPM forneceram valores significativamente maiores que os tratamentos com 0% e 3% de inclusão de OPM (Figura 2 A-B-C-D e Figura 3 A-B-C e Tabela 7).

Figura 2. Resultados obtidos para A - porcentagem de velocidade rápida (SptzRápido), média (SptzMédio) e lenta (SptzLento %), B - velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), C - velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), D- velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$) após alimentação com inclusão de PUFAs- ω 3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 105 dias.



Legendas: Espermatozoide rápido – SptzRápido; Espermatozoide médio – SptzMédio; Espermatozoide lento - SptzLento. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

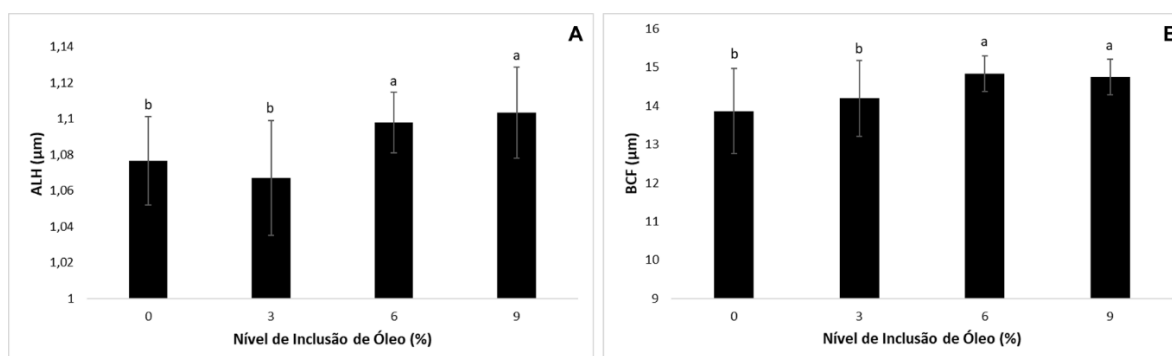
Figura 3. Resultados obtidos para A - linearidade (LIN, %), B - coeficiente de retilinearidade (STR, %) e C- oscilação média da trajetória espacial (WOB, %), após alimentação com inclusão de PUFAs-ô3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 105 dias.



Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

Os maiores valores para ALH e BCF foram observados nos tratamentos com maior quantidade inclusão de óleo (6 e 9%) que diferiram estatisticamente dos tratamentos sem inclusão de OPM e com 3% de OPM. (Figura 4 A-B).

Figura 4. Resultados obtidos para A- amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e B - frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), após alimentação com inclusão de PUFAs-ô3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 105 dias.



Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

DISCUSSÃO

A qualidade dos gametas é fundamental para obtenção de altas taxas de fertilização e eclosão no processo de reprodução, sendo considerado um fator limitante para o sucesso reprodutivo (Gallego *et al.*, 2013; Köprücü; Yonar; Özcan, 2015). No caso dos espermatozoides essa motilidade pode ser avaliada e mensurada por meio dos parâmetros relacionados à capacidade de fertilização dos espermatozoides, que podem incluir dentre outros, a motilidade espermática total e progressiva, a rapidez da movimentação dos espermatozoides, concentração espermática, a presença de anormalidades morfológicas nos gametas e a integridade da membrana plasmática (Fauvel *et al.*, 2010; Gallego *et al.*, 2013).

Existem estudos que comprovam que a introdução de maiores quantidades de PUFA's na dieta dos peixes, melhoram a qualidade do sêmen (Köprücü; Yonar; Özcan, 2015; Yonar; Köprücü; Özcan, 2020). Segundo Lahnsteiner *et al.* (2009), os lipídios são os principais recursos energéticos dos espermatozoides em salmonídeos, sendo importantes para manter a viabilidade espermática. Fato perceptível em nosso trabalho com *Astyanax lacustris*, já que muitos dos parâmetros utilizados para avaliação da qualidade seminal apresentaram um aumento positivo com a introdução do óleo de peixe marinho na dieta dos reprodutores.

No presente estudo os tratamentos com maior inclusão de óleo (6 e 9%) apresentaram menor volume seminal quando comparados com o tratamento sem inclusão de OPM e 3% de OPM, no entanto para as espécies *Dicentrarchus labrax* (Asturiano *et al.*, 2001) e *Oncorhynchus mykiss* (Köprücü; Yonar; Özcan, 2015) a suplementação com PUFA's-n3 resultou em maior volume seminal quando comparados ao controle. Tais resultados podem estar relacionados com a diferença da fisiologia das referidas espécies, que possuem diferentes ciclos reprodutivos e vivem em ambientes mais frios, como também a necessidade de um refinamento dos estudos para determinar a causa da queda da produção seminal.

Para *Oncorhynchus mykiss* (Köprücü; Yonar; Özcan, 2015) e *Sparus aurata* (Ferozekhan *et al.*, 2021) foi observado que a duração da motilidade

espermática foi aumentada pela inclusão de PUFAs- ω 3 na dieta de reprodutores destas espécies, no nosso estudo o tratamento com 6% de OPM resultou em maior duração da motilidade, no entanto não sem diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tratamento sem inclusão de OPM. No entanto, neste estudo os resultados demonstram que para *A. lacustris* a inclusão de óleo limite para a melhoria deste parâmetro foi de 6%, pois com a maior inclusão (9%) a duração da motilidade foi significativamente reduzida.

Em relação aos parâmetros de concentração espermática e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, a inclusão de óleo de peixe marinho não influenciou positivamente ou negativamente, podendo ser considerado que a quantidade de espermatozoides por volume de sêmen é uma característica relacionada a espécie e que, a integridade da membrana está mais relacionada a boa genética dos exemplares utilizados.

Quanto a presença de gametas sem deformidades de formação, não houve alteração significativa considerando a inclusão ou não de PUFAs- ω 3 na dieta, resultado também observado para *Rhamdia quelen* (Rodrigues *et al.*, 2022) com suplementação da dieta com diferentes fontes de PUFAs. O que se pode destacar é que, apesar de não ser observada diferença estatística, o tratamento sem inclusão de OPM propiciou um menor percentual de espermatozoides normais, podendo conjecturar que apesar de não haver uma melhora significativa o PUFAs- ω 3 influenciou no quesito formação celular.

O efeito dos PUFAs sobre a motilidade também foi observado para *Oncorhynchus mykiss* (Köprücü; Yonar; Özcan, 2015) onde o uso de uma dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados n-3 aumentou a motilidade em comparação com o controle (sem adição de PUFAs-n3). Butts *et al.* (2015) verificou efeito semelhante para o sêmen de *Anguilla anguilla* que a adição de ácidos graxos poli-insaturados (EPA, DHA e ARA) na alimentação dos reprodutores resultou em um aumento significativo da motilidade espermática. Em nosso experimento utilizando uma metodologia de análise de motilidade mais sensível corroborou os relatos acima com outras espécies de peixes em que a inclusão de PUFAs- ω 3 proporciona um aumento na motilidade espermática e, mais especificamente em nosso experimento com *A. lacustris* a MOT e PRG.

Os parâmetros cinéticos espermáticos VCL, VSL e VAP, também foram afetadas positivamente a partir da dieta com 6% de óleo de peixe marinho, sendo esta influência corroborada por Luo *et al.* (2017), que verificaram que as dietas contendo maior quantidade de PUFA resultou em aumento da cinética de espermatozoides de *Acipenser baerii*. Efeito importante uma vez que estes parâmetros cinéticos têm sido utilizados como indicadores de qualidade espermática, sendo altamente correlacionados com a capacidade de fertilização, pois propiciam que os espermatozoides encontrem e penetrem na micrópila mais rapidamente (Figuerola *et al.*, 2016; Gallego *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2018).

De acordo com Beirão *et al.* (2011), espermatozoides de peixes com trajetória mais lineares foram os que tiveram maior correlação com a taxa de fertilização, demonstrando que está característica é das mais importantes a ser levado em conta na determinação da qualidade seminal em peixes. Em nosso experimento os tratamentos de maior inclusão de óleo (6 e 9%) propiciaram o aumento substancial do percentual de espermatozoides rápidos e dos parâmetros cinéticos LIN, STR, WOB e BCF corroborando ainda mais a ideia que os PUFA são benéficos para melhoria da qualidade dos espermatozoides de *A. lacustris*.

De acordo com Kowalski *et al.*, 2006 e Król *et al.*, 2009 o parâmetro ALH pode ser tido indicador de maturação espermática, no nosso em nosso experimento, os tratamentos 6 e 9% de inclusão de OPM propiciaram valores significativamente maiores para ALH, no entanto é necessário pontuar que essa maior movimentação lateral da cabeça pode prejudicar o movimento do espermatozoide em direção a micrópila, prejudicando a fertilização.

CONCLUSÕES

Assim, podemos concluir que a inclusão de óleo de peixe marinho purificado contendo altos níveis de PUFAS-ô3 trouxe benefícios à qualidade seminal de *Astyanax lacustris*. Os tratamentos 6 e 9% de inclusão de óleo de peixe marinho proporcionaram melhor qualidade dos parâmetros seminais avaliados. No entanto, levando em consideração que as diferenças entre os dois tratamentos em relação aos itens avaliados são sutis, que o aumento do percentual de óleo a ser utilizado é de 50% entre os tratamentos com 6% e 9% de OPM, e considerando uma relação custo/benefício, pode-se concluir que o tratamento com 6% de inclusão de óleo foi o melhor tratamento para a melhorar a qualidade seminal de *A. lacustris*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTURIANO, J. F.; SORBERA, L. A.; CARRILLO, M.; ZANUY, S.; RAMOS, J.; NAVARRO, J. C.; 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**, v. 194, p. 173-190, 2001.

BEIRÃO, J.; CABRITA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HERRÁEZ, M. P. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. **Cryobiology**, v. 62 (1), p. 22-31, 2011.

BOBE, J.; LABBÉ C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 535-548, 2010.

BRAMBILA-SOUZA, G.; MYLONAS, C. C.; MELLO, P. H.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R.; TOLUSSI, C. E. Thermal manipulation and GnRH α therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, v. 279, p. 120-128, 2019.

BUTTS, I. A. E.; BAEZA, R.; STOTTRUP, J. G.; KRÜGER-JOHNSEN, M.; JACOBSEN, C.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; TOMKIEWICZ, J. Impact of dietary fatty acids on muscle composition, liver lipids, milt composition and sperm performance in European eel. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 183, p. 87-96, 2015.

CARNEIRO-LEITE, L.; BASHIYO-SILVA, C.; OLIVEIRA, Y. A. A.; BORGES, L. P.; SANCHEZ, M. P.; SILVA, L. G.; LOBATO, S. I. R.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA A. Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethylsulfoxide and methylglycol. **Neotropical Ichthyology**, v. 18 (3), p. 1-20, 2020.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 636-643, 2010.

FEROSEKHAN, S.; TURKMEN, S.; PÉREZ-GARCÍA, C.; XU, H.; GÓMEZ, A.; SHAMNA, N.; AFONSO, J. M.; ROSENLUND, G.; FONTANILLAS, R.; GRACIA, A.; IZQUIERDO, M.; KAUSHIK, S. Influence of Genetic Selection for Growth and Broodstock Diet n-3 LC-PUFA Levels on Reproductive Performance of Gilthead Seabream, *Sparus aurata*. **Animals**, v. 11, p. 519-540, 2021.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; MERINO, O.; UBILLA, A.; RISOPATRÓN, J.; FARIAS, J. G. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. **Journal of Fish Biology**, v. 89 (3), p. 1537-1550, 2016.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B. A.; VALENTI, W. C. Lambari Aquaculture as a Means for the Sustainable Development of Rural Communities in Brazil. **Reviews In Fisheries Science & Aquaculture**, p. 1-16, 2017.

GALLEGO, V.; CAVALCANTE, S. S.; FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; MARIA, A. N. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology**, v. 87, p. 16-24, 2017.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoamotility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). **Aquaculture**, v. 416-417, p. 238-243, 2013.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia**, v.13, p. 65-88, 2000.

HACHERO-CRUZADO, I.; OLMO, P.; SÁNCHEZ, B.; HERRERA, M.; DOMINGUES, P. The effects of an artificial and a natural diet on growth, survival and reproductive performance of wild caught and reared brill (*Scophthalmus rhombus*). **Aquaculture**, v. 291, p. 82-88, 2009.

HAJIAHMADIAN, M.; MOGHANLOU, K. S. ARDABILI, F. F. Semen characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following diets containing different vegetable fatty acid levels. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 979-984, 2016.

HARSHAVARDHAN, M. A.; AANAND, S.; KUMAR, S. S.; SENTHILKUMAR, V. Comparative evaluation of commercial vegetable oil, fish oil, palm oil and groundnut oil as a lipid source in maturation and reproductive performance of fancy koi, *Cyprinus carpio* var. *koi*. **Aquaculture**, v. 545, p. 1-8, 2021.

HOSSEN, M. S.; REZA, A. H.; M. M.; RAKHI, S. F.; TAKAHASHI, K.; HOSSAIN, Z. Effects of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on gonadal maturation and spawning of striped gourami, *Colisa fasciatus*. **International Aquatic Research**, v. 6 (2), p. 1-13, 2014.

IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, p. 25-42, 2001.

JAYA-RAM, A.; KUAH, M.; LIM, P.; KOLKOVSKI, S.; SHU-CHIEN, A. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNA expression in female zebrafish *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 277, p. 275-281, 2008.

KÖPRÜCÜ, K., YONAR, M. E., & ÖZCAN, S. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on antioxidant defense and sperm quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under regular stripping conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 135–143, 2015.

KOWALSKI, R. K.; HLIWA, P.; ANDRONOWSKA, A.; KRÓL, J.; DIETRICH, G. J.; WOJTCZAK, M.; STABIŃSKI, R.; CIERESZKO, A. Semen biology and

stimulation of milt production in the European smelt (*Osmerus eperlanus* L.). **Aquaculture**, v. 261 (2), p. 760-770, 2006.

KRÓL, J.; KOWALSKI, R. K.; HLIWA, P.; DIETRICH, G. J.; STABIŃSKI, R.; CIERESZKO, A. The effects of commercial preparations containing two different GnRH analogues and dopamine antagonists on spermiation and sperm characteristics in the European smelt *Osmerus eperlanus* (L.). **Aquaculture**, v. 286 (3-4), p. 328-331, 2009.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. **Aquaculture**, v. 298, p. 118-124, 2009.

LEITE, J. S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; CAMPELLO, C. C.; CAMPOS, A. C. N.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Seasonal variation in seminal quality in Brazilian bocachico (Teleostei, Characiformes). **Revista Caatinga**, v. 31 (3), p. 759-766, 2018.

LING, S., KUAH, M. K.; MUHAMMAD, T. S. T.; KOLKOVSKI, S.; SHU-CHIEN, A. C. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNA in female swordtail *Xiphophorus helleri*. **Aquaculture**, v. 261, p. 204-214, 2006.

LOPES, J. T.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; NASCIMENTO, R. V.; FERREIRA, Y. M.; MONTENEGRO, A. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Efeito de vitaminas e aminoácidos como suplementação da solução crioprotetora para a criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p.1593–600, 2018.

LUO, L.; AI, L.; LIANG, X.; HU, H.; WU, X. n-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids improve the sperm, egg, and offspring quality of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Aquaculture**, v.473, p. 266-271, 2017.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; COSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-187, 2011.

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

MYLONAS C. C.; DUCAN, N. J.; ASTURIANO, J. F. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. **Aquaculture**, v. 472, p. 21-44, 2017.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 516-534, 2010.

- NG, W. K.; WANHG, Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. **Aquaculture**, v. 314, p. 122-131, 2011.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 651-659, 2006.
- NORAMBUENA, F.; ESTEVEZ, A.; BELL, G.; CARAZO, I.; DUNCAN, N. Proximate and fatty acid compositions in muscle, liver and gonads of wild versus cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), **Aquaculture**, v. 356–357, p. 176-185, 2012.
- RODRIGUES, M. L.; BARCELLOS, L. J. G.; MORO, E. B.; SOSA, B. S.; GOMES, R. L. M.; BITTENCOURT, F.; SANCHES, E. A.; SIGNOR, A. Gonad development and sperm characteristics of male silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed diets with different oil sources. **Brazilian Journal of Development**, v. 8 (4), p. 24032–24051, 2022.
- SABBAG, O. J.; TAKAHASHI L. S.; SILVEIRA, N. A.; ARANHA A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo amarelo em Monte Castelo/ SP: um estudo de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37(3), p. 307–315, 2011.
- STREIT-JR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; VARGAS, L. D. M.; WATANABE, A. L. Qualitative parameters of the piapara sêmen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68 (3), p. 373-377, 2008.
- VALDEBENITO, I. I.; GALLEGOS, P.T.; EFFER, B. R. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. **Zygote**, v. 23, p. 177-197, 2013.
- WATANABE, T.; ARAKAWA, T.; KITAJIMA, C.; FUJITA, S. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 50 n. 3, p. 495–501, 1984.
- WATANABE, T.; VASSALLO-AGIUS, R. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. **Aquaculture**, v. 227, p. 35-61, 2003.
- YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9(3), p. 464–70, 2014.
- YONAR, S. M.; KÖPRÜCÜ.; ÖZCAN, S. Dietary profile of n-3 series LC-PUFAs in rainbow trout under regular stripping condition: Semen production and quality, hepato-somatic index, haemato-immunologic values, oxidative stress and fatty acid composition of liver, muscle and sêmen. **Aquaculture Research**, v. 51, p. 370-378, 2020.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 367-373, 2007.

ZHANG, J.; MA, W.; XIE, B.; GUI, J. F.; MEI, J. Beneficial effect and potential molecular mechanism of chloroquine on sperm motility and fertilizing ability in yellow catfish. **Aquaculture**, v. 468, p. 307-313, 2017.

6. CAPÍTULO III

Influência de dietas contendo diferentes níveis de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na criopreservação do sêmen de *Astyanax lacustris*

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a influência do óleo de peixe marinho (OPM) rico em PUFA- ω 3 na dieta de machos *Astyanax lacustris* na qualidade do sêmen criopreservado. Para tal, 400 machos foram dispostos em 20 caixas de 180 L em sistema de recirculação e alimentados com dietas isoproteicas (32% PB) contendo 0, 3, 6 e 9% de inclusão de óleo de peixe marinho durante 1 ano. Após, induzidos hormonalmente à espermiacção e o sêmen coletado após 226 UTAs, avaliado e diluído em duas soluções crioprotetoras na proporção 1:9 (sêmen: diluente): 1 – dimetilformamida 10% + glicose 5%; 2 – dimetilformamida 10% + NaCl 0,8%, envasado em palhetas de 0,25 mL e congelados em vapor de nitrogênio. Após 30 dias as amostras foram descongeladas e avaliados a cinética espermática, integridade de membrana, morfologia, composição lipídica do sêmen e capacidade de fertilização. A solução 1 não propiciou diferença entre tratamentos para a maioria dos parâmetros cinéticos, sendo os maiores valores obtido no tratamento sem inclusão de OPM, porém a solução 2 resultou em diferenças para todos os parâmetros cinéticos com exceção de ALH, sendo os maiores valores obtidos no tratamento sem inclusão de OPM e este diferiu apenas do tratamento com 9% de OPM. Todos os protocolos testados para criopreservação ocasionaram aumento de alterações morfológicas nos espermatozoides, mas propiciaram a integridade de membrana e capacidade de fertilização. Pode-se concluir que, a inclusão de óleo de peixe marinho até 6% não influenciou nos parâmetros cinéticos após a descongelação, com melhores resultados obtidos no tratamento sem inclusão de OPM. Preservando também a capacidade de fertilização dos espermatozoides criopreservados de *Astyanax lacustris*.

Palavras-chave: congelação, óleo de peixe marinho, qualidade do sêmen.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of marine fish oil (OPM) rich in PUFAs- ω 3 in the diet of *Astyanax lacustris* males on the quality of cryopreserved semen. For this purpose, 400 males were placed in 20 boxes of 180L in a recirculation system and fed isoprotein diets (32% CP) containing 0, 3, 6 and 9% inclusion of marine fish oil for one year. Upon, they were hormonally induced to spermiation and the semen collected after 226 UTA, evaluated and diluted in two cryoprotective solutions in a 1:9 ratio (semen: diluent): 1 – 10% dimethylformamide + 5% glucose; 2 – 10% dimethylformamide + 0.8% NaCl, packaged in 0.25mL straws and frozen in nitrogen vapor. After 30 days the samples were defrosted and evaluated for sperm kinetics, membrane integrity, morphology, semen lipid composition and fertilization capacity. Solution 1 did not provide differences between treatments for most kinetic parameters, the highest values being obtained in the treatment without inclusion of OPM, however solution 2 resulted in differences for all kinetic parameters with the exception of ALH, the highest values being obtained in the treatment without inclusion of OPM and this differed only from the treatment with 9% of OPM. All protocols checked for cryopreservation caused an increase in morphological changes in sperm, but provided membrane integrity and fertilization capacity. It can be concluded that the inclusion of marine fish oil up to 6% did not influence the kinetic parameters after defrosting, with better results obtained in the treatment without inclusion of OPM. Also preserving the fertilization capacity of cryopreserved sperm of *Astyanax lacustris*.

Keywords: freezing, marine fish oil, semen quality.

INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma biotecnologia de armazenamento de células e tecidos em temperaturas ultra baixas, geralmente em nitrogênio líquido a -196°C por longos períodos, sem a perda da viabilidade funcional e estrutural (Carvalho, 2012). Neste sentido, o desenvolvimento desta técnica é fundamental para o estabelecimento de bancos genéticos que propiciarão a conservação de material genético de espécies de peixes nativos em perigo ou ameaçadas de extinção, o que permite o desenvolvimento de projetos de recuperação ou manutenção de ambientes aquáticos com resultados mais concretos. Como também, para a utilização pelos piscicultores, contribuindo substancialmente para o desenvolvimento da produção aquícola no país, pois possibilita a disponibilidade de gametas (espermatozoides) durante todo o ano, e elimina a assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas e reduz os gastos com a manutenção de um grande número de reprodutores em sistemas intensivos de produção, o que facilita a inserção de genes melhorados ou selvagens, aumentando assim a diversidade genética do plantel, e evita a endogamia e facilitando os processos de melhoramento genético das espécies (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2021; Dhanasekar; Selvakumar; Munuswamy, 2022; Fujimoto *et al.*, 2022).

Entretanto, a aplicação dos protocolos para criopreservação nos espermatozoides os expõe a processos agressivos como: exposição a substâncias químicas que podem apresentar certa toxicidade, abaixamento rápido da temperatura, seguido da congelação a temperaturas extremamente baixas e, posteriormente, exposição à um processo de aquecimento para uma descongelação rápida. Assim, os gametas podem ficar expostos à formação de cristais de gelo intra e extracelular, além da exposição a um estresse osmótico e oxidativo, o que pode levar a ocorrências lesões morfológicas, perda de energia e de danos a estrutura de seu DNA, levando a uma redução da qualidade seminal, com diminuição das características de motilidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, da sua capacidade de fertilização (Figuroa *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2017; Díaz *et al.*, 2019; Xin *et al.*, 2019; Dhanasekar; Selvakumar; Munuswamy, 2022; França *et al.*, 2022).

Visando minimizar e/ou inibir danos que podem ser gerados pela aplicação dos protocolos criogênicos aos gametas, são desenvolvidas soluções

crioprotetoras ou extenders que podem ser compostas por várias substâncias, com diferentes funções: 1) sais, açúcares e proteínas (NaCl, glicose, gema de ovo, lactose, etc.), que têm a função de proteger os espermatozoides do frio e do estresse osmótico e oxidativo, além de estabilizar a membrana plasmática e fornecer nutrientes para as células; 2) substâncias químicas crioprotetoras, como o dimetilsulfóxido, o metanol e a dimetilformamida que tem a função de desidratar as células e diminuir o ponto crioscópico dos meios intra e extracelulares, evitando a formação de cristais de gelo que podem danificar os espermatozoides (Viveiros *et al.*, 2012; Salmito-Vanderley *et al.*, 2014, Best, 2015; López; Leal; Viveiros, 2015; Bhattacharya; Prajapati, 2016; Salmito-Vanderley; Almeida-Monteiro; Nascimento, 2016; Pinheiro *et al.*, 2016; Elliott; Wang; Fuller, 2017; Perry *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2022; Maulida *et al.*, 2023).

Outro fator que influencia a qualidade do sêmen criopreservado é a nutrição adequada dos reprodutores, fator fundamental para uma gametogênese correta com a formação adequada dos espermatozoides e, da composição do fluido seminal. Produzindo assim, um sêmen de alta qualidade, com gametas mais resistentes às etapas que compõem os protocolos para criopreservação seminal (Pustowka *et al.*, 2000; Izquierdo; Fernández-Palacios; Tacon, 2001; Vassallo-Agius *et al.*, 2001; Beirão *et al.*, 2015).

A qualidade da ração dos reprodutores é fator fundamental, nesse sentido, e com a ideia de atuar na qualidade da formação das células gaméticas e de disponibilidade energética, a inclusão de óleo de peixe e de vegetais ricos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) nas rações, com ênfase ao PUFAs- ω 3, pode alterar a composição lipídica da membrana dos espermatozoides, visto que a membrana é lipoproteica e rica em PUFAs, podendo torná-la mais fluida, resistente e com maior permeabilidade. A fluidez dessa membrana é determinada pela temperatura do ambiente e pela composição dos fosfolipídios, do colesterol, bem como do grau de insaturações dos ácidos graxos e a interação lipídio-proteína. A maior fluidez e permeabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides propicia uma maior resistência quando da aplicação dos protocolos criogênicos, nos quais estão envolvidos os processos de desidratação e hidratação celular e mudanças do estado físico do meio intra e extracelular, resultando em uma melhor qualidade seminal pós

descongelamento. (Pustowka *et al.*, 2000; Beirão *et al.*, 2015; Horokhovatskyi *et al.*, 2016; Klaiwattana *et al.*, 2016; Dadras *et al.*, 2017; Samaee; Manteghi; Estévez, 2018; Xin *et al.*, 2020).

Vários experimentos relatam que a adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) nas rações dos reprodutores melhora a qualidade sêmen criopreservado, aumentando a motilidade total e os vários aspectos cinéticos dos espermatozoides, a duração da motilidade espermática, a capacidade de fertilização e a qualidade das larvas produzidas (Pustowka *et al.*, 2000; Cabrita *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2014). Como também foi relatado que, a adição de PUFAs na solução crioprotetora também melhora a qualidade do sêmen descongelado de peixes marinhos e de água doce demonstrando assim a importância dos PUFAs para a otimização do processo de criopreservação (Bozkurt; Yavaş, 2021; Díaz *et al.*, 2021).

No entanto, uma maior permeabilidade da membrana dos espermatozoides pela troca de lipídios, quando da diluição do sêmen pelo extender, poderia alterar a composição da fluido intracelular, além de diluir o fluido seminal tornando os gametas mais suscetíveis ao estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica, principalmente durante o processo de criopreservação, pois estas alterações poderiam modificar o sistema de defesa natural antioxidante seminal pela diminuição da concentração desses antioxidantes no meio. Assim, a adição exagerada de PUFAs na dieta pode maximizar esse efeito negativo, o que acabaria afetando função espermática e diminuindo a qualidade seminal pós descongelação (Klaiwattana *et al.*, 2016; Sandoval-Vargas *et al.*, 2021).

Astyanax lacustris conhecida popularmente como lambari-do-rabo-amarelo é pertencente à família Characidae, possui pequeno porte, rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, podendo ser reproduzida durante todo o ano com alta de fecundidade, além disso é utilizada como modelo biológico (Orsi; Carvalho; Foresti, 2004; Sabbag *et al.*, 2011; Gonçalves; Ferroli; Viegas, 2012; Stevanato; Ostrensky, 2018; Rocha *et al.*, 2020; Brambila-Souza *et al.*, 2021). Além disso possui grande interesse econômico particularmente pelo mercado de iscas-vivas e também para o consumo direto (Fonseca; Costa-Pierce; Valenti,

2017). No entanto até o momento não há nenhum protocolo de criopreservação estabelecido para a espécie.

Assim, este estudo tem por objetivo avaliar a influência de dietas contendo óleo de peixe marinho rico em PUFAs-ô3 na criopreservação do sêmen de *Astyanax lacustris*, que mantenha a viabilidade e funcionalidade dos espermatozoides da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, no Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO). Todos os procedimentos técnicos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira no processo CEUA- 12/2019 FEIS/UNESP.

Dietas experimentais

Foram formuladas 4 dietas isoproteicas distintas (32% PB) (Tabela 1) com três níveis de inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) purificado contendo altos níveis de PUFA- ω 3 (3, 6 e 9% na dieta) e um dieta controle sem inclusão de óleo (0%), totalizando quatro tratamentos. Antes do processamento da ração, as mesmas foram submetidas a análises bromatológicas (Laboratório de Bromatologia, UNESP, Campus de Ilha Solteira) (Tabela 1), bem como análise do perfil de ácidos graxos do óleo de peixe marinho e das quatro dietas (Laboratório de Estudos de Fisiologia Animal, UNESP, Campus Ilha Solteira e Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, USP/ Campus São Paulo) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Ingredientes e composição centesimal de dietas experimentais para reprodutores de *Astyanax lacustris* (valores expressos em % da matéria natural).

Ingredientes	Dieta experimentais (%)			
	0	3	6	9
Farelo de soja	31,00	32,00	32,00	32,50
Milho	22,27	24,37	17,97	14,00
Quirera de arroz	16,00	10,90	14,00	12,70
Farinha de peixe (tilápia)	15,00	15,00	15,30	15,00
Glúten de milho	7,00	7,00	7,00	7,00
Farelo de trigo	6,00	5,00	5,00	7,22
Óleo de peixe marinho	0,00	3,00	6,00	9,00
Fosfato bicálcio	1,50	1,50	1,45	1,40
Calcário	0,40	0,40	0,45	0,35
Premix ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT, antioxidante	0,30	0,30	0,30	0,30
Antifúngico (Filax)	0,03	0,03	0,03	0,03
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
Calculada²				
Matéria Seca (%)	91,54	91,88	92,06	92,29
Proteína Bruta (%)	32,00	32,00	32,00	32,00
Extrato Etéreo (%)	3,11	6,11	8,96	11,84
Matéria Mineral (%)	7,12	7,15	7,15	7,17
Fibra Bruta (%)	2,84	2,77	2,69	2,90
Extrato Não Nitrogenado ³ (%)	44,09	41,47	38,89	36,15
Energia Bruta (kcal/kg)	3,965	4,136	4,293	4,464
Cálcio	1,50	1,50	1,53	1,46
Fósforo	0,75	0,75	0,75	0,73
Lisina	1,90	1,91	1,92	1,92
Metionina	0,67	0,66	0,66	0,65

(¹) Mineral mix (Premix Raguife; Santa fé do Sul. SP. Brasil) por 5 Kg por tonelada: Fe 20,00 g/kg; Cu 3.500,00 mg/kg; Zn 24,00 g/kg; I 160,00 mg/kg; Mn 10,00 mg/kg; Se 100,00 mg/kg; Co 80,00 mg/kg; vitamina A 2.400.000,00 UI/kg; vitamina D3 600.000,00 UI/kg; vitamina E 30.000,00 UI/kg; vitamina K3 3.000,00 mg/kg; vitamina C 60,00 g/kg; vitamina B1 4.000,00 mg/kg; vitamina B2 4.000,00 mg/kg; vitamina B6 3.500,00 mg/kg; vitamina B12 8.000,00 mcg/kg; inositol 25,00 g/kg; colina 100,00 g/kg; Ac pantotênico 10,00 g/kg; biotina 200,00 mg/kg; Ac. Fólico 1.200,00 mg/kg; niacina 20,00 g/kg; antioxidante *etc 5.000,00 mg/kg. (²) Com base na análise da composição dos ingredientes. (³) Extrato isento de nitrogênio (NFE) = matéria seca - (proteína bruta + lipídeo + matéria mineral + fibra bruta). **Fonte:** próprio autor.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (% do total detectado) de óleo de peixe marinho utilizado na composição de dietas experimentais para reprodutores de *Astyanax lacustris*.

Ácidos graxos	Óleo de peixe
C18:0	0,78
C18:1	1,12
C18:2n6	4,41
C18:3n3	31,92
C20:4n3	7,95
C20:5n3	8,98
C22:5n3	35,29
C22:6n3	9,54

Fonte: próprio autor.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (%) detectado nas quatro dietas fornecidas aos reprodutores *Astyanax lacustris*.

Ácidos Graxos (%)	Dietas experimentais (%)			
	0	3	6	9
C14:0	1,65	1,54	1,67	1,94
C16:0	20,00	16,95	8,87	9,41
C16:1	3,04	2,92	4,50	3,34
C18:0	3,85	4,25	5,02	4,43
C18:1	31,42	6,32	6,68	5,74
C18:2n6 (LA)	34,36	16,38	7,82	7,10
C18:3n3 (ALA)	0,28	2,15	3,17	2,30
C18:3n6	1,82	7,41	4,50	1,16
C18:4n3	0,72	4,28	6,09	4,50
C20:2n6	0,00	1,56	0,35	0,96
C20:3n6	0,30	4,14	3,74	4,51
C20:4n6 (ARA)	0,66	8,14	7,66	5,07
C20:5n3 (EPA)	0,72	8,96	11,40	18,80
C22:5n3	0,14	1,71	1,91	2,39
C22:6n3 (DHA)	1,20	13,25	27,24	27,37
SAT	25,50	22,74	15,56	15,78
MUFA	34,47	9,24	11,18	9,08
PUFA	40,18	67,99	73,88	74,16
PUFAn6	37,13	37,64	24,07	18,80
PUFAn3	3,05	30,35	49,81	55,36

Fonte: próprio autor.

Delineamento experimental

Foram utilizados 400 machos de *A. lacustris*, com peso médio de $2,08 \pm 0,44$ g e comprimento total médio de $5,4 \pm 0,39$ cm. Estes foram distribuídos em 20 caixas de polietileno de 180 L dispostas em um sistema de recirculação, com uma densidade de 20 peixes por caixa.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Os tratamentos foram compostos por quatro níveis inclusão de óleo de peixe marinho (OPM) rico em PUFA- ω 3: 0 - ração sem inclusão de PUFA- ω 3 (0% de OPM); 3 - ração com inclusão de 3% de PUFA- ω 3 (3% de OPM); 6 - ração com inclusão de 6% de PUFA- ω 3 (6% de OPM) e; 9 - ração com inclusão de 9% de PUFA- ω 3 (9% de OPM). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9h e 17h) até a saciedade aparente durante o período de 12 meses. Durante todo período experimental foram monitoradas seguintes variáveis físico-químicas da água dos quatro tratamentos: pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica medidas todo dia em dois períodos pela manhã e à tarde por meio de medidor multiparâmetros (ASKO - AK88v2). E a amônia total e nitrito foram mensurados três vezes na semana, utilizando o Kit Testes Alcon Labcon (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis de qualidade de água registradas durante o período experimental de 12 meses.

Variáveis	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
Temperatura (°C)	$28,8 \pm 2,06$	$28,6 \pm 1,71$	$28,7 \pm 1,68$	$28,6 \pm 1,79$
pH	$7,7 \pm 0,38$	$7,8 \pm 0,40$	$7,7 \pm 0,39$	$7,9 \pm 0,31$
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	$4,8 \pm 2,48$	$5,1 \pm 2,38$	$5,7 \pm 1,26$	$4,9 \pm 2,19$
Amônia total (ppm)	0	0	0	0
Condutividade elétrica (μ S cm ⁻¹)	$328 \pm 60,35$	$326 \pm 28,36$	$330 \pm 17,06$	$334 \pm 28,75$
Nitrito (μ g L ⁻¹)	0	0	0	0

Fonte: próprio autor.

Indução hormonal e Coleta do sêmen

Após o período de um ano, os machos de *A. lacustris* foram induzidos hormonalmente, utilizando Ovopel® (GnRh – análogo + Dopamina) em dosagem única (3mg/kg de peixe vivo) (Yasui *et al.*, 2015). Após 226 unidades térmicas acumuladas (226 UTAs), (Carneiro-Leite *et al.*, 2020) os machos foram sedados com solução de benzocaína a 1% (SIGMA – ALDRICH E1501), sendo o sêmen extrusado por meio de massagem abdominal no sentido anteroposterior do corpo, e coletado com auxílio de micropipetas de 10 - 100µl (KASVI-K1-100B), evitando a contaminação com fezes, urina ou sangue.

Criopreservação do sêmen e descongelação seminal

Antes do processo de criopreservação foi realizada a análise do sêmen fresco utilizando o programa computadorizado de análise espermática - CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (ISAS® Integrated Semen Analysis System, Proiser, Valência, Espanha) e apenas as amostras com motilidade total, igual ou superior a 80% foram utilizadas para a congelação, tendo como média geral: MOT 86,28±7,6%, PRG 63,75±7,5%, Sptzrápidos 71,65±10,0%, Sptzmédios 8,1±4,4%, Sptzlentos 5,98±3,2, VCL 81,86±7,1µm/s, VSL 68,05±7,5µm/s, VAP 76,50±7,4µm/s, LIN 82,93±3,9%, STR 88,79±2,5%, WOB 93,34±2,0%, ALH 1,14±4,5µm e BCF 14,80±7,6µm.

Para a criopreservação o sêmen coletado foi dividido em três pools (20 animais por pool) por tratamento, posteriormente o sêmen foi diluído na proporção 1:9 (sêmen:solução) e criopreservados em duas soluções crioprotetoras composta por: solução 1 – dimetilformamida 10% + glicose 5%; solução 2 – dimetilformamida 10% + NaCl 0,8%, estas soluções foram escolhidas após testes pilotos. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL e congelados em vapor de nitrogênio (caixa de isopor 40 cm x 28 cm x 35 cm) posicionados em rampa de nitrogênio a 2 cm da superfície do nitrogênio por 10 minutos e após mergulhados em nitrogênio e posteriormente armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (-196°C). Após o período de trinta dias as amostras foram descongeladas por imersão em banho maria a 40°C por 5s.

Análises pós descongelamento

Composição lipídica do sêmen

O perfil de ácidos graxos das frações totais do sêmen foi analisado por transmetilação direta, utilizando método descrito por Parish *et al.*, (2015). Foram utilizado um pool (100µl) de sêmen fresco de cada tratamento para determinação da composição lipídica do sêmen fresco e para o sêmen descongelado foi utilizada uma palheta (250µl) dos três pools de cada solução crioprotetora para os quatro tratamentos. Amostras foram homogeneizadas em 3mL da solução metanol: diclorometano: ácido clorídrico concentrado (10: 1: 1 v:v:v) e mantidas em banho-maria por 2 horas a 80°C. Após a retirada e resfriamento, foram adicionados 1mL de água destilada, 1,8 mL de solução hexano: diclorometano (4:1 v:v). Após, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e a camada superior orgânica removida e transferida para vials de injeção.

A determinação do perfil dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás (Varian GC 3900) acoplado a ionizador de chama (FID) e auto-injetor. A identificação dessas moléculas foi feita com base nos tempos de retenção, utilizando-se padrões compostos de metil ésteres (FAME) (SUPELCO, 37 components, Larodan Chemical Company - Mixture Me93 e Qualmix PUFA fish M - Menhaden Oil), com resultados expressos em %.

Cinética espermática

A cinética espermática foi avaliada usando um sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (ISAS[®] Integrated Semen Analysis System, Proiser, Valência, Espanha) acoplado a um microscópio de contraste de fase UB200i (UOP/Proiser) com uma objetiva de contraste de fase negativa 10x. As imagens foram capturadas com câmera ISAS 782C (Proiser, Espanha) e processadas com software CASA usando 50 frames por segundo (fps). O sêmen foi ativado pela adição 40µl de água do meio à 0,2µl de sêmen em uma câmera Makler[™] (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel), e análise realizada após 10s de ativação. Foram avaliados a motilidade total (MOT, %), motilidade progressiva (PRG, %), espermatozoides rápidos (SptzRápido, %) médios (Sptzmédios, %) e lentos

(Sptz lentos, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), coeficiente de retilinearidade (STR, %), oscilação média da trajetória espacial (WOB, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz). Espermatozoides com VAP < 10 $\mu\text{m/s}$ foram considerados imóveis, com > 25 $\mu\text{m/s}$ médios e > 50 $\mu\text{m/s}$ rápidos. Todas as análises foram realizadas para os quatro tratamentos 0%, 3%, 6% e 9% de OPM.

Integridade da membrana

A integridade da membrana espermática foi medida pelo método de coloração eosina-nigrosina, para esta análise os espermatozoides descongelados foram corados na proporção 1:10:10 (sêmen:eosina:nigrosina), sendo considerados vivos quando permaneciam incolores, indicando membrana íntegra; ou mortos, quando corados de rosa, indicando membrana rompida de acordo com Lopes *et al.* (2018). Foram utilizados três pools por tratamento e contados 200 espermatozoides por pool utilizando um microscópio de luz (Olympus CX41) em aumento de 40X.

Normalidade morfológica

Para análise dos danos morfológicos o sêmen descongelado dos três pools de cada tratamento foi fixado em solução formol-salina proporção de 1:100 (sêmen: fixador), corados com rosa bengala, na proporção de 1:10 (corante: sêmen) e após, 10 μl foi depositado em uma lâmina de vidro e cobertos com lamínula e avaliados (Streit-Junior *et al.*, 2008). Em cada lâmina foram analisados 100 espermatozoides, sendo a análise realizada sob microscopia ótica (Zeiss/AXIOCAM-MRc5), em ampliação de 1000X. Os espermatozoides foram classificados em normais ou danificados, sendo os danos classificados apenas em alterações primárias (macrocefalia, microcefalia, degeneração na cabeça e na peça intermediária, cauda fraturada, coto da cauda e cauda fortemente enrolada) e secundárias (cabeça normal livre, cauda dobrada simples, gota proximal e distal) de acordo com Miliorini *et al.* (2011).

Fertilização

Para fertilização foram utilizadas fêmeas maduras de *A. lacustris* que não estavam submetidas aos tratamentos (0, 3, 6 e 9% de OPM). Para isso as fêmeas foram induzidas hormonalmente, utilizando Ovopel® em dosagem única (3mg/kg de peixe vivo) (Yasui *et al.*, 2015). Após um período de oito horas foi realizada a extrusão dos oócitos por meio de massagem abdominal. Para fertilização foi realizado um pool de 15 fêmeas, e dividido em placas de petri, sendo utilizado aproximadamente 1.500 oócitos para cada palheta ($1,3 \times 10^9$ espermatozoides/mL), também foi realizado um controle com sêmen fresco para comparação entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamento.

Posteriormente o sêmen descongelado foi misturado aos oócitos em placa de Petri, sendo o sêmen ativado com água do meio e após 2 minutos os óvulos foram transferidos para placas de Petri armazenadas em incubadoras de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a uma temperatura 26°C (Yasui *et al.*, 2015). A taxa de fertilização foi determinada 3 horas após a fecundação no estágio de blástula, para isso os ovos foram fixados em solução de Karnovsky e realizado a contagem para determinar a porcentagem de fertilização. O resultado é dado pela fórmula $\text{Fertilização (\%)} = (\text{Número de fertilizados} / \text{Total de ovócitos}) \times 100$.

Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade dos erros e homoscedasticidade. A análise de variância ($p < 0,05$) foi aplicada aos dados, sendo aplicado o teste de Tukey para os dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos para comparação entre os quatros tratamentos. E para comparação entre as soluções crioprotetoras foram utilizados o teste T para os dados paramétricos e teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico R Studio.

RESULTADOS

Composição lipídica do sêmen

Composição lipídica do sêmen fresco

O perfil de ácidos graxos do sêmen fresco de cada tratamento está disposto na Tabela 6. O sêmen do tratamento sem inclusão de OPM teve uma porcentagem média de ácidos graxos de 50,44% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), 38,26% de ácidos graxos saturados (SAT) e 11,30% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). O tratamento com 3% de OPM teve 50,52% de MUFA, 39,02% de SAT e 10,47% de PUFAs. Já para o tratamento com 6% de OPM a maior porcentagem média ácidos graxos foi de SAT (48,65%), seguido por 33,96% de MUFA e 17,39% de PUFAs. E o tratamento com 9% de OPM também teve maior porcentagem de SAT (43,44%), depois MUFA com 38,49% e 18,07% de PUFAs (Tabela 6).

Tabela 6. Composição lipídica do sêmen fresco dos quatros tratamentos (0, 3, 6 e 9% de OPM) após alimentação com inclusão de PUFAs- ω 3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 1 ano.

Ácidos Graxos (%)	Nível de Inclusão de Óleo (%)			
	0	3	6	9
C14:0	2,35	4,38	7,75	4,23
C16:0	10,65	9,24	6,65	13,25
C16:1	1,29	1,28	0,79	1,13
C18:0	7,54	10,84	2,53	8,81
C18:1n9	19,42	5,94	4,06	21,04
C18:2n6 (LA)	0,77	1,20	1,30	1,03
C18:3n3 (ALA)	0,75	0,79	2,20	0,37
C18:3n6	0,46	0,43	0,32	0,56
C18:4n3	1,22	1,28	3,62	1,32
C20:0	17,73	14,56	31,72	17,16
C20:1	29,73	43,30	29,11	16,32
C20:2n6	0,65	0,90	1,85	0,62
C20:3n6	0,21	0,36	0,36	0,69
C20:4n6 (ARA)	0,78	0,15	0,56	3,93
C20:5n3 (EPA)	4,06	4,58	5,21	3,89
C22:5n3	0,51	0,02	0,40	1,86
C22:6n3 (DHA)	1,90	0,76	1,57	3,82
SAT	38,26	39,02	48,65	43,44
MUFA	50,44	50,52	33,96	38,49
PUFA	11,30	10,47	17,39	18,07
PUFA N3	8,43	7,44	13,00	11,25
PUFA N6	2,87	3,03	4,39	6,82

Composição lipídica do sêmen descongelado

Para a composição lipídica do sêmen descongelado foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para ambas as soluções utilizadas (Tabela 7). Primeiramente para solução 1, foi observada diferença significativa para o ácido esteárico (C18:0) sendo a maior porcentagem encontrada no tratamento sem inclusão de OPM e este diferiu apenas do tratamento com 9% de OPM. O ácido linoleico (C18:2n6, LA) foi maior no tratamento com 6% de OPM e este diferiu estatisticamente dos tratamentos com 3% e 9% de OPM (Tabela 7). Também foi observada diferença significativa para os ácidos estearidônico (C18:4n3) e ácidos araquidônico (C20:4n6, ARA) para ambos o tratamento com 6% de OPM teve maior quantidade e este diferiu apenas do

tratamento com 3% de OPM. O percentual de ácido docosapentaenóico (C22:5n3) foi maior no tratamento sem inclusão de OPM, diferindo significativamente apenas em relação ao tratamento com 6% de OPM (Tabela 7).

Também foi observada diferença significativa para MUFA que foi encontrado em maior porcentagem no tratamento com 3% de OPM diferindo apenas do tratamento com 6% de OPM que apresentou menor quantidade. Para PUFA e PUFA-n6 também foi observada diferença ($p > 0,05$) sendo o tratamento com 6% de OPM o que teve maior porcentagem desses ácidos e este diferiu apenas do tratamento com 3% de OPM que teve menor porcentagem (Tabela 7).

Com relação a solução 2, o ácido esteárico (C18:0) apresentou diferença significativa, sendo maior nos tratamentos sem inclusão de OPM e 3% de OPM e diferindo dos tratamentos com maior inclusão (6 e 9%). O ácido dihomo-gama-linolênico (C20:3n6) foi maior no tratamento com 6% de OPM e este diferiu estatisticamente apenas do tratamento sem inclusão de OPM. Também foram observadas diferenças significativas para PUFA com maiores porcentagens nos tratamentos com 3% e 6% de OPM, diferindo apenas do tratamento sem inclusão de OPM. Para a porcentagem de PUFA-n3 o tratamento com 6% de OPM teve maior valor, e este diferiu apenas do tratamento sem inclusão de OPM que teve o menor valor. Já o PUFA-n6 foi maior no tratamento com 3% de OPM diferindo estatisticamente apenas do tratamento sem inclusão de OPM (Tabela 7).

Para diferença entre as soluções dentro cada tratamento, também foi observada diferenças significativas (Tabela 7). O tratamento sem inclusão de OPM apresentou diferença significativa para o ácido graxo palmitoléico (C16:1) e PUFA-n3 com maior quantidade quando utilizado a solução 1 para criopreservação. O MUFA também apresentou diferença ($p > 0,05$), porém a maior porcentagem foi observada quando utilizado a solução 2. Para o tratamento com 3% de OPM foi observado diferença significativa entre as soluções para os ácidos esteárico (C18:0), araquidônico (C20:4n6, ARA) e ácido docosahexaenóico (C22:6n3, DHA) sendo os maiores valores obtidos utilizando a solução 2 no congelamento (Tabela 7).

No tratamento com 6% de inclusão de OPM foram observadas diferenças significativas entre as soluções apenas para o ácido gama linolênico (C18:3n6) que foi maior quando utilizada a solução 2, e para PUFA-n6 que teve maior porcentagem quando foi usada a solução 1 no congelamento. Para o tratamento com 9% de OPM não foi observada nenhuma diferença entre as soluções utilizadas para o processo de criopreservação (Tabela 7).

Tabela 7. Composição lipídica do sêmen descongelado dos quatros tratamentos (0, 3, 6 e 9% de OPM) após alimentação com inclusão de PUFAs-ô3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 1 ano.

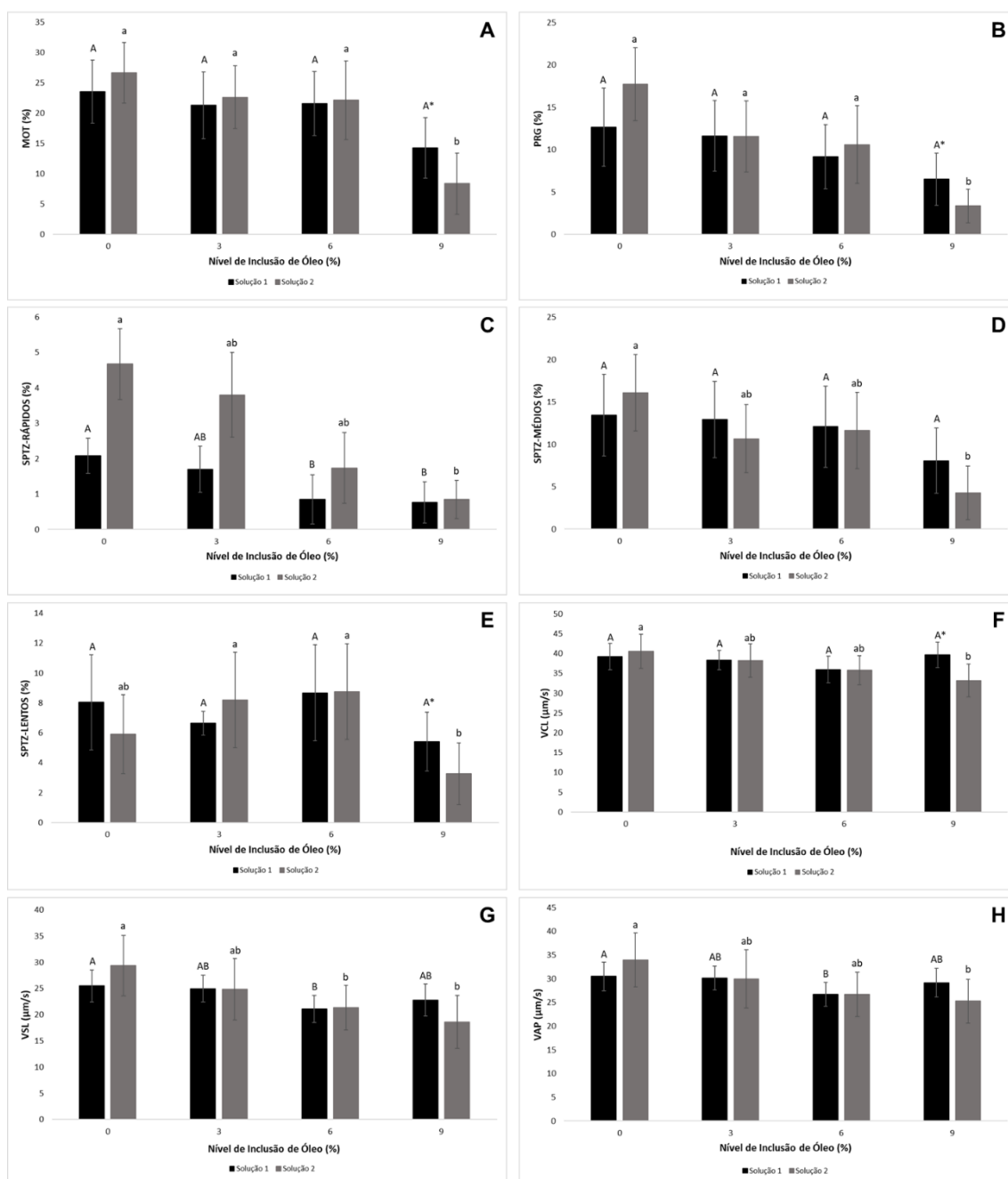
Ácidos Graxos (%)	Nível de Inclusão de Óleo (%)							
	0		3		6		9	
	Solução 1	Solução 2	Solução 1	Solução 2	Solução 1	Solução 2	Solução 1	Solução 2
C14:0	6,54±0,3	5,82±1,5	7,56±4,2	5,87±0,7	6,85±2,5	10,31±2,2	5,99±0,6	6,65±3,5
C16:0	15,98±1,1	14,51±2,4	15,99±5,2	14,43±2,4	14,32±0,4	12,00±2,9	13,23±3,0	11,84±1,6
C16:1	2,62±0,2 *	1,33±0,6	2,97±0,4	2,11±0,3	2,21±0,8	2,06±0,4	1,60±0,1	2,35±0,8
C18:0	10,49±0,9 A	9,48±1,4 a	8,65±0,3 AB *	9,94±0,2 a	9,51±0,1 AB	7,87±1,0 b	7,68±1,1 B	7,06±0,2 b
C18:1n9	21,91±3,0	22,19±4,8	27,92±11,7	16,56±3,5	15,89±3,7	16,63±5,2	16,43±4,9	20,74±11,9
C18:2n6 (LA)	1,62±0,07 AB	1,15±0,7	0,84±0,2 B	2,14±1,3	2,06±0,6 A	1,43±0,7	0,64±0,4 B	1,32±0,8
C18:3n3 (ALA)	3,67±0,9	2,52±0,7	3,33±2,3	4,64±2,6	8,70±1,4	4,39±3,4	6,16±5,0	2,31±0,5
C18:3n6	0,73±0,02	1,10±0,2	1,03±0,2	1,15±0,2	1,05±0,08 *	1,25±0,02	1,13±0,1	1,17±0,01
C18:4n3	3,52±0,4 AB	3,10±1,0	2,65±1,7 B	3,73±1,3	6,99±0,8 A	4,49±3,7	5,76±4,82 AB	1,74±0,08
C20:0	4,08±0,02	7,38±3,9	3,43±1,6	4,88±0,6	2,24±0,8	5,18±2,9	4,47±1,7	8,62±0,1
C20:1	9,96±2,3	15,22±5,2	11,30±5,4	11,38±2,0	8,27±0,7	11,08±4,2	15,97±5,9	15,90±3,8
C20:2n6	3,14±0,07	3,00±1,2	2,07±1,6	2,97±0,9	4,89±0,8	3,05±1,1	4,55±3,4	2,03±0,2
C20:3n6	1,23±0,6	0,26±0,2 b	0,80±,2	1,99±1,1 a	1,40±0,3	0,63±0,3 ab	1,03±1,3	0,64±1,1 ab
C20:4n6 (ARA)	0,85±0,3 AB	1,26±0,5 ab	0,58±0,4 B *	2,03±0,5 a	1,76±0,3 A	1,02±0,3 b	0,77±0,4 AB	1,93±0,01 ab
C20:5n3 (EPA)	6,11±3,0	8,02±2,3	7,31±1,1	10,19±3,1	10,31±1,8	14,16±2,3	8,87±0,3	11,79±6,0
C22:5n3	4,98±2,3 A	1,62±1,4	1,19±0,8 AB	1,18±0,4	0,96±0,3 B	1,95±1,2	2,67±1,0 AB	1,02±0,6
C22:6n3 (DHA)	2,46±1,1	1,97±0,2	2,36±0,5 *	4,74±1,1	2,60±0,3	2,43±2,0	3,06±0,8	2,82±2,4
SAT	37,11±0,1	37,20±3,2	35,64±3,6	35,13±2,8	32,92±2,9	35,38±4,7	31,36±6,5	34,19±2,1
MUFA	34,50±0,9 AB *	38,75±1,3	42,19±9,1 A	30,05±5,5	26,37±2,1 B	29,77±5,7	34,00±10,4 AB	38,99±7,2
PUFA	28,37±0,7 AB	24,04±2,3 b	22,17±9,0 B	34,80±6,9 a	40,71±1,3 A	34,83±10,5 a	34,64±16,9 AB	26,80±5,0 ab
PUFA N3	20,77±0,4 *	17,24±1,8 b	16,83±6,7	24,49±5,4 ab	29,55±0,7	27,43±9,8 a	26,52±11,6	19,69±7,4 ab
PUFA N6	7,60±0,2 AB	6,79±0,6 b	5,33±2,3 B	10,30±1,8 a	11,16±1,0 A *	7,40±1,0 ab	8,11±5,3 AB	7,10±2,3 ab

Legendas: Solução 1 – DMF 10% + glicose 5%; Solução 2 – DMF 10% + NaCl 0,8%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 1. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 2 (Kruskal-Wallis, Tukey, p<0,05). *Indica diferença estatística entre as soluções para cada tratamento (Teste T, Mann-Whitney, (p<0,05)). **Fonte:** próprio autor.

Análise cinética espermática

Na análise de parâmetros cinéticos foram observadas diferenças significativas em alguns parâmetros avaliados entre os tratamentos, para as duas soluções utilizadas para criopreservação. No uso da solução 1 (DMF 10% + glicose 5%) em relação aos parâmetros MOT, PRG, Sptz-médios e lentos, VCL, LIN, STR, WOB, ALH e BCF não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1 A-B-D-E-F, Figura 2 A-B-C-D-E). O percentual de Sptz-rápidos, foi superior ($p < 0,05$) para o tratamento sem inclusão de OPM em relação aos tratamentos com 6 e 9% de OPM. (Figura 1 C). A tratamento sem inclusão de OPM também resultou em maiores valores ($p < 0,05$) para VLS e VAP, deferindo apenas do tratamento com inclusão de 6% OPM. (Figura 1 G-H).

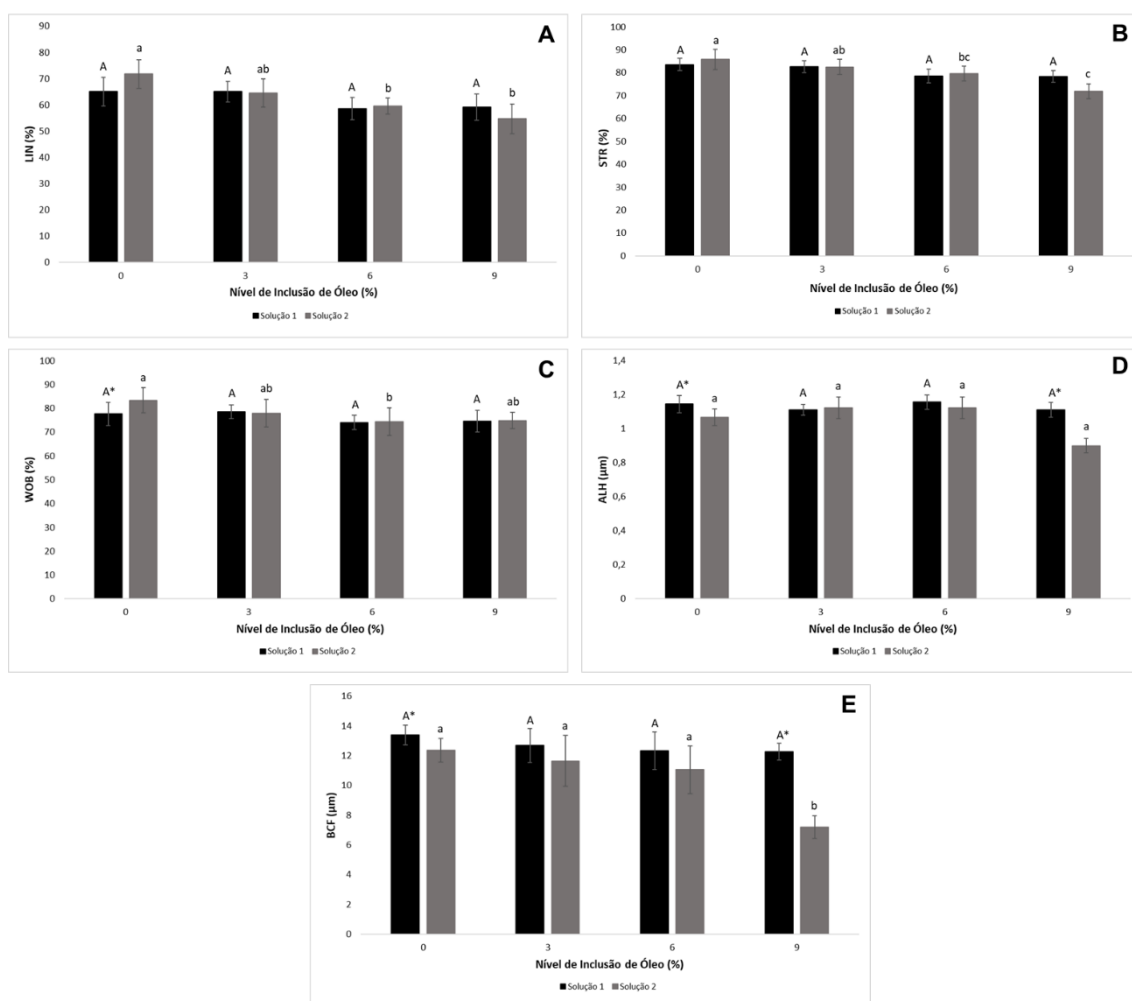
Figura 1. Resultados obtidos para A - motilidade espermática total (MOT, %), B - progressiva (PRG, %), C - porcentagem de espermatozoides rápidos (SptzRápidos, %), D - porcentagem de espermatozoides médios (SptzMédios, %), E - porcentagem de espermatozoides lentos (SptzLentos, %), F – velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), G - velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$) e H - velocidade média (VAP, $\mu\text{m/s}$) do sêmen descongelado, após a aplicação da alimentação com a inclusão PUFAs- $\omega 3$ na dieta de *Astyanax lacustris* pelo período de de 1 ano.



Legendas: Solução 1 – DMF 10% + glicose 5%; Solução 2 – DMF 10% + NaCl 0,8%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 1. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 2 (Kruskal-Wallis, Tukey, $p < 0,05$). *Indica diferença estatística entre as soluções dentro de cada tratamento (Teste T, Mann-Whitney, ($p < 0,05$)). **Fonte:** próprio autor.

Para a solução 2 (DMF 10% + NaCl 0,8%) foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para a maioria dos parâmetros avaliados, com exceção de ALH. Para MOT, PRG, Sptz-rápidos e médios, VCL, VAP e BCF, o tratamento sem inclusão de OPM propiciou os maiores valores, diferindo em relação ao tratamento com 9% de OPM (Figura 1 A-B-C-D-F-H, Figura 2 E,). O tratamento sem inclusão de OPM resultou ainda em maiores valores para VSL, LIN e STR, diferindo significativamente em relação aos tratamentos com 6% e 9% de OPM (Figura 1 G, Figura 2 A-B). Em relação ao parâmetro WOB, o tratamento sem inclusão de OPM só diferiu estatisticamente e positivamente apenas do tratamento com 6% de OPM (Figura 2 C). Com relação ao percentual de espermatozoides lentos (Sptz-lentos) o tratamento com 9% de OPM proporcionou valor significativamente menor que os outros tratamentos (Figura 1 E).

Figura 2. Resultados obtidos para A - linearidade (LIN, %), B - coeficiente de retilinearidade (STR, %), C- oscilação média da trajetória espacial (WOB, %), D - amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e E - frequência de batimento cruzado (BCF, Hz) do sêmen descongelado, após alimentação com inclusão de PUFAs- $\omega 3$ na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 1 ano.



H

Legendas: Solução 1 – DMF 10% + glicose 5%; Solução 2 – DMF 10% + NaCl 0,8%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 1. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 2 (Kruskal-Wallis, Tukey, $p < 0,05$). *Indica diferença estatística entre as soluções dentro de cada tratamento (Teste T, Mann-Whitney, ($p < 0,05$)). **Fonte:** próprio autor.

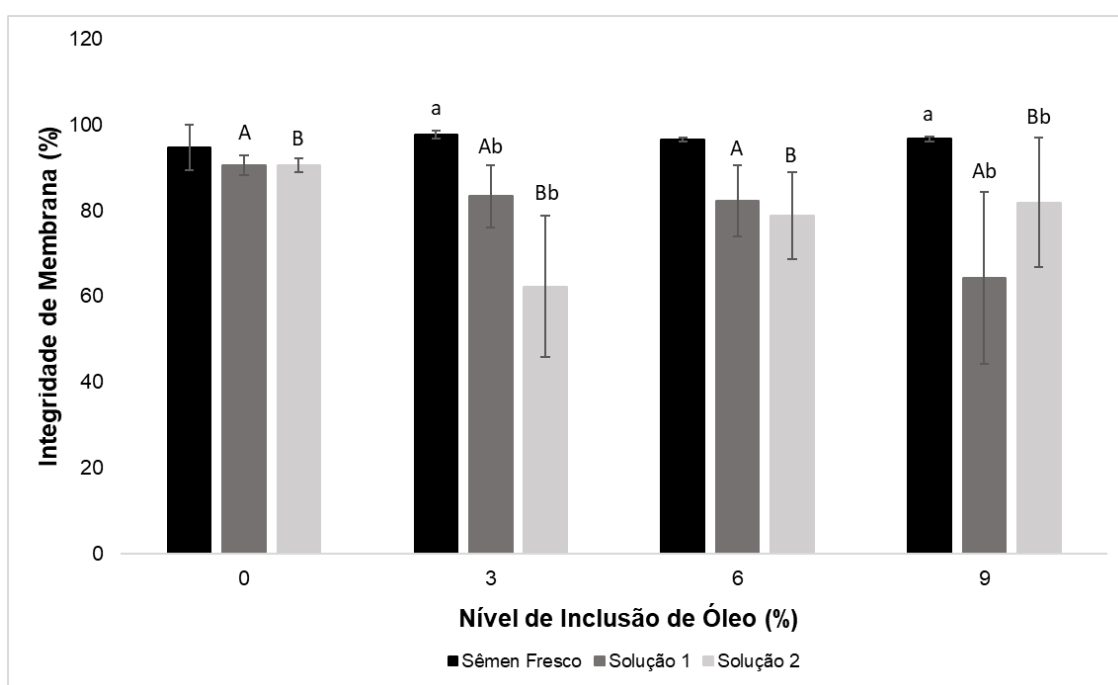
Em relação a diferença entre as soluções dentro de cada tratamento, foram observadas diferenças apenas para os tratamentos sem inclusão de OPM e com 9% de OPM. No tratamento sem inclusão de OPM foi observada diferença para o parâmetro WOB, para o qual a solução 2 propiciou maior percentual ($83,34 \pm 5,2\%$) e, para ALH e BCF em que o uso da solução 1 resultou em maiores

valores ($1,14 \pm 0,1 \mu\text{m}$ e $13,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$) para estes parâmetros (Figura 2 C-D-E). Em relação ao tratamento com 9% de inclusão de OPM foram observadas diferenças significativas para MOT, PRG, Sptz-lentos, VCL, ALH e BCF e para todos estes parâmetros a utilização da solução 1 resultou em maiores valores (Figura 1 A-B-E-F, Figura 2 D-E).

Integridade de membrana

Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos para a integridade de membrana (Figura 3).

Figura 3. Resultados obtidos para integridade de membrana dos espermatozoides descongelados, após alimentação com inclusão de PUFAs- $\omega 3$ na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 1 ano.



Legendas: Solução 1 – DMF 10% + glicose 5%; Solução 2 – DMF 10% + NaCl 0,8%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para cada solução. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamento (Kruskal-Wallis, Tukey, $p < 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

Em relação a diferença entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamento, apenas os tratamentos com 3% e 9% de inclusão de OPM apresentaram diferenças significativas, onde o sêmen fresco teve maior porcentagem de espermatozoides íntegros ($97,66 \pm 0,8$ e $96,66 \pm 0,5\%$) e este diferiu da solução 1 e 2 para ambos os tratamentos (Figura 3).

Normalidade morfológica

Todos os tratamentos independentemente da solução utilizada resultaram em 100% de espermatozoides com danos após descongelamento, com exceção do tratamento sem inclusão de OPM utilizando a solução 2 e o tratamento com 9% de OPM utilizando a solução 1 que tiveram 1% de espermatozoides normais, no entanto o próprio sêmen fresco de cada tratamento já apresentava baixa quantidade de espermatozoides normais (Tabela 5).

Para a solução 1 não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a quantidade de espermatozoides normais ou com defeitos, assim como para alterações primárias e secundárias (Tabela 5). Para a solução 2 foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a porcentagem de alterações primárias no qual o tratamento com 6% de inclusão de OPM teve a maior valor ($94,0 \pm 2,7\%$), mas este diferiu apenas do tratamento com 3% de OPM que teve o menor valor ($81,33 \pm 2,7\%$). Para as alterações secundárias a maior porcentagem foi encontrada no tratamento com 3% de OPM ($18,66 \pm 2,7\%$) e este diferiu apenas do tratamento com 6% de OPM ($6,0 \pm 0,8\%$) (Tabela 5).

Com relação a diferença entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamentos, todos os tratamentos apresentaram diferença entre o sêmen fresco e as duas soluções para a porcentagem de espermatozoides normais, sendo o fresco que teve maiores porcentagens. Efeito contrário foi observado para a quantidade de danos, em que para todos os tratamentos a utilização de ambas as soluções resultaram em maiores porcentagens de danos independentemente do tratamento. Para a porcentagens de alterações primárias e secundárias não foram observadas diferenças significativas entre as soluções e o sêmen fresco para nenhum dos tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados obtidos para normalidade morfológica dos espermatozoides, após alimentação com inclusão de PUFA- ω 3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 1 ano.

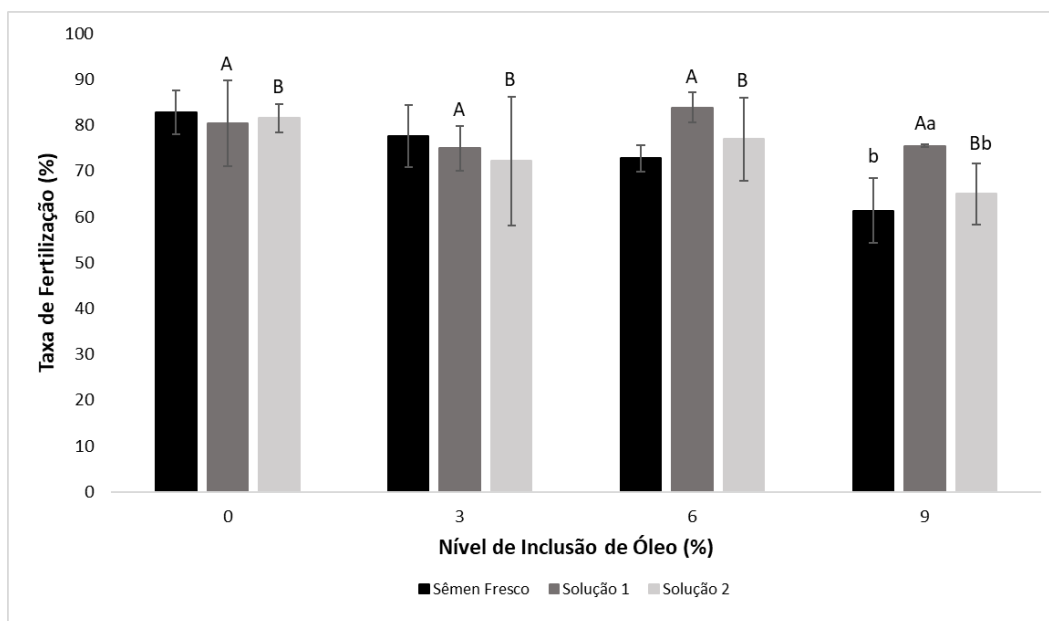
	Nível de Inclusão de Óleo (%)											
	0			3			6			9		
	Sêmen Fresco	Solução 1	Solução 2	Sêmen Fresco	Solução 1	Solução 2	Sêmen Fresco	Solução 1	Solução 2	Sêmen Fresco	Solução 1	Solução 2
Alterações Primárias	75 \pm 6,2	92,33 \pm 4,0 A	91,33 \pm 5,1 ab	73,33 \pm 8,8	75,66 \pm 6,4 A	81,33 \pm 2,7 b	79 \pm 4,0	87,66 \pm 8,4 A	94,0 \pm 2,7 a	77,33 \pm 5,4	91 \pm 2,6 A	89,0 \pm 5,4 ab
Alterações Secundárias	6,66 \pm 3,1	7,66 \pm 4,0 A	8,0 \pm 4,6 ab	10,33 \pm 4,5	24,33 \pm 6,4 A	18,66 \pm 2,7 b	8 \pm 1,5	12,33 \pm 8,4 A	6,0 \pm 0,8 a	8 \pm 1,7	8,66 \pm 2,7 A	11,0 \pm 5,4 ab
Defeitos Totais (%)	75 \pm 5,1*	100 \pm 0,0 A	99 \pm 0,0 a	77 \pm 5,4*	100 \pm 0,0 A	100 \pm 0,0 a	87 \pm 2,6*	100 \pm 0,0 A	100 \pm 0,0 a	82 \pm 5,1*	99 \pm 0,0 A	100 \pm 0,0 a
Normal (%)	18,33 \pm 5,1*	0 A	1 a	16,33 \pm 5,4*	0 A	0 a	13 \pm 2,6*	0 A	0 a	14,66 \pm 5,1*	1 A	0 a

Legendas: Solução 1 – DMF 10% + glicose 5%; Solução 2 – DMF 10% + NaCl 0,8%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 1. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para a solução 2 (Kruskal-Wallis, Tukey, $p < 0,05$). *Indica diferença estatística entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamento (Kruskal-Wallis, Tukey, $p < 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

Fertilização

Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos para a taxa de fertilização (Figura 4).

Figura 4. Resultados obtidos para taxa de fertilização do sêmen fresco e criopreservado, após alimentação com inclusão de PUFAs-ô3 na dieta de *Astyanax lacustris* por um período de 1 ano.



Legendas: In (%) – percentual de inclusão de óleo de peixe marinho; Solução 1 – DMF 10% + glicose 5%; Solução 2 – DMF 10% + NaCl 0,8%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para cada solução. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamento (Kruskal-Wallis, Tukey $p < 0,05$). **Fonte:** próprio autor.

Em relação a diferença entre as soluções e o sêmen fresco dentro de cada tratamento, apenas o tratamento com 9% de inclusão de OPM apresentou diferença significativa, sendo a solução 1 responsável pela maior taxa de fertilização ($75,46 \pm 0,3\%$) e está diferenciado da solução 2 ($64,97 \pm 6,6\%$) e do sêmen fresco ($61,36 \pm 7,0\%$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Para todos os parâmetros cinéticos analisados independente da solução crioprotetora utilizada houve uma redução acentuada nos valores dos parâmetros em relação ao sêmen fresco, algo esperado, uma vez que o processo de congelação/descongelação diminui a qualidade do sêmen para maioria das espécies de peixes, são diversos os fatores que podem estar relacionados com essa perda de qualidade, tais como danos na morfologia, no DNA, na membrana do espermatozoide, na mitocôndria, nas proteínas, fisiológico, etc. (Li; Liu; Zhang, 2006; Xin *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos demonstraram que quando utilizada a solução 1 composta por DMF e glicose, a inclusão de óleo de peixe marinho não influenciou nos parâmetros de MOT, PRG, Sptz-médios e lentos, VCL, LIN, STR, WOB, ALH e BCF no entanto este resultado pode ser efeito da solução crioprotetora utilizada uma vez que quando utilizada a solução 2 composta por DMF e NaCl, foi verificada influência significativa da inclusão de óleo peixe marinho para diversos parâmetros cinéticos demonstrando assim haver uma influência da solução utilizada para o congelamento.

Nossos dados diferem dos já relatados para a espécie *Oreochromis spp* e no qual o uso de diferentes fontes de óleos na dieta resultou no aumento da motilidade pós descongelação, sendo a maior motilidade obtida com a suplementação com óleo de peixe (Navarro *et al.*, 2014) e no nosso estudo o uso do óleo de peixe não aumentou a motilidade pós descongelação. Além disso a adição de ácidos graxos específicos (ácido oleico, linoleico e araquidônico, DHA) diretamente na solução crioprotetora também melhorou a motilidade pós descongelamento do sêmen de *Salmo salar* e *Salmo trutta macrostigma* (Bozkurt, Yavaş, 2021; Díaz *et al.*, 2021).

Essas diferenças observadas entre os estudos podem ser explicadas por serem espécies diferentes, assim como pela utilização de soluções crioprotetoras diferentes, uma vez que para *Oreochromis spp* foi verificada a influência do tipo de crioprotetor utilizado tanto para motilidade antes do congelação quanto pós congelação (Navarro *et al.*, 2014) fato também observado neste trabalho em que a utilização da solução 1 não resultou em

diferenças significativas para maioria dos parâmetros e a solução 2 teve efeito contrário o que sugere uma associação entre o óleo de peixe e as o componente das soluções.

Ainda sobre a utilização solução 2, para todos os parâmetros cinéticos, com exceção de WOB, o tratamento com 9% de OPM resultou em menores valores, demonstrando que uma inclusão de óleo superior a 6% causa uma diminuição da qualidade do sêmen descongelado, sendo que essa baixa qualidade pode estar associada à menor quantidade de ácidos saturados (SAT) encontrada no sêmen descongelado desse tratamento, quando comparado com os demais tratamentos. Fato já confirmado em *Cyprinus carpio* (Horokhovatskyi *et al.*, 2016) no qual foi verificado que os espermatozoides com motilidade pós descongelamento menor (<10%) a porcentagem de ácidos saturados era significativamente mais baixa, quando comparados aos com maior motilidade (40%).

Quando comparado as duas soluções utilizadas dentro de cada tratamento, o tratamento sem inclusão de OPM foram observadas diferenças para os parâmetros WOB, ALH e BCF em que a solução 1 proporcionou maiores valores. Já quando avaliado o tratamento com 9% de OPM foi observada diferença para MOT, PGR, Sptz lentos, VCL, WOB, ALH e BCF, sendo a solução 1 mais eficaz para manter a viabilidade do sêmen.

Isso demonstra que para o tratamento com 9% de OPM há uma interação entre a quantidade de óleo utilizada e os componentes dos diluentes (Sol.1 – glicose; Sol. 2 - NaCL) testados, visto que quando utilizada a Sol.2, ocorre uma perda expressiva da motilidade e progressividade do sêmen características importantes na determinação da qualidade do sêmen, demonstrando assim uma interação negativa neste caso.

Os diluidores têm como função impedir a ativação do sêmen, por isso deve ter osmolalidade igual ou superior ao do plasma seminal da espécie, além de fornecer nutrientes e energia aos espermatozoides (Contreras *et al.*, 2019; Maulida *et al.*, 2022). Além disso já é sabido que o tipo e quantidade de diluente é específico para cada espécie e, que há interação entre o crioprotetor, os componentes do diluente e do sêmen. Para *Epinephelus akaara* o uso de DMSO associado com glicose resultou em alta taxa de espermatozoides moveis pós

descongelamento, no entanto quando o DMSO foi usado juntamente com NaCl não foram encontrados espermatozoides móveis após o descongelamento (Ahn; Park; Lim, 2018). Esse efeito também já foi relatado para *Prochilodus brevis* no qual houve uma diferença entre o uso de metilglicol com glicose e BTS™ (Pinheiro *et al.*, 2016), interação este que pode também ser indicado nos resultados deste projeto.

Em relação as soluções crioprotetoras, a solução 2 composta por DMF e NaCl foi responsável pelos maiores valores obtidos neste estudo para MOT, PRG, Sptzrápidos e médios, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB após o descongelamento, demonstrando ser mais eficaz para o congelamento do sêmen de *A. lacustris*. Esses resultam enfatizam ainda que, crioprotetor dimetilformamida (DMF), aqui testado, foi eficaz para manter a viabilidade do sêmen de *A. lacustris*, sendo o recomendando para espécie visto que outros crioprotetores tais como: dimeltisufoxido (DMSO) e metilglicol associados a glicose também usada neste estudo, assim como Bestvile Thawing Solution (BTS™) já foram testadas para a espécie e não foi obtida motilidade após o descongelamento, no entanto é necessário pontuar que os protocolos utilizados possuem diferenças entre si (Carneiro-Leite *et al.*, 2020).

Além disso de acordo com Pustowka *et al.* (2000) níveis mais altos de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) nos espermatozoides fornecem a esses maior resistência ao processo de criopreservação, o que explicaria o fato dos maiores valores obtidos para estes parâmetros, terem sido obtido no tratamento sem inclusão de OPM e utilizando a solução 2 visto os espermatozoides descongelados desta solução, tinham uma porcentagem significativamente maior de MUFAs quando comparado a solução 1 deste tratamento.

A porcentagem de espermatozoides com membrana intacta não apresentou diferença significativas entre os tratamentos, demonstrando que não houve influência da inclusão de óleo de peixe marinho. No entanto nos tratamentos com 3% e 9% de OPM foi verificado que independentemente da solução utilizada as porcentagens de espermatozoides com membrana intacta foram significativamente menores do que o sêmen fresco. Isso pode ser explicada pela diferença na composição lipídica dos espermatozoides destes tratamentos em relação aos demais tratamentos, uma vez que que a composição

lipídica da membrana está relacionada à integridade da membrana, estabilidade estrutural e capacidade de fertilização dos espermatozoides (Pustowka *et al.*, 2000).

A criopreservação resultou em danos morfológicos em praticamente 100% dos espermatozoides de *A. lacustres*, independente do tratamento ou solução crioprotetora utilizada. Um aumento da porcentagem de anormalidades no sêmen após a criopreservação é comum e esperado (Lassen *et al.*, 2021; Motta *et al.*, 2022; Medina-Robles *et al.*, 2023). Essas anormalidades espermáticas são resultado provavelmente do estresse osmótico e oxidativo, assim como processos biofísicos como cristalização intra e extracelular ao qual essas células são submetidas (Chatiza *et al.*, 2011; Medina-Robles *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2020).

Ainda de acordo com a análise realizada por Lassen *et al.* (2021) sobre os efeitos da criopreservação sobre a morfologia dos espermatozoides, de acordo com trabalhos já publicados, o aumento de danos pós congelamento se dá principalmente em anormalidades classificadas como primárias, fato observado no nosso estudo para maioria dos tratamentos quando comparadas as soluções e o sêmen fresco. De acordo com Streit-Junior *et al.* (2009) o aumento das anormalidades primárias está relacionado ao processo de criopreservação. Além disso à análise do sêmen fresco de cada tratamento revelou ainda que o próprio sêmen fresco tinha uma baixa porcentagem de espermatozoides normais (<20%), o que pode explicar a alta ausência de espermatozoides normais no sêmen descongelado.

Essa grande quantidade de anormalidades após o processo de criopreservação pode ainda explicar a redução da motilidade espermática pós descongelamento, visto que no estudo realizado com *Rhamdia quelen* mostrou que há uma alta correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides normais e a motilidade (Costa *et al.*, 2019). No entanto, esta alta porcentagem de anormalidades não afetou o processo de fertilização já que todos os tratamentos tiveram altas taxas. No estudo com *Colossoma macropomum* também foi verificado que, apesar do processo de criopreservação aumentar a porcentagem de anormalidades a fertilização não foi afetada (Medina-Robles *et al.*, 2019).

A composição lipídica da membrana dos espermatozoides em relação a razão de colesterol/fosfolípidios e ácidos graxos, juntamente com a temperatura influencia na permeabilidade a água e outras moléculas, na fluidez, e na transição de fase da bicamada lipídica, sendo por isso um fator determinante para a resistência dos espermatozoides ao processo de criopreservação, uma vez que o congelamento e descongelado leva a alterações na organização de fosfolípidios, colesterol, assim como modificação de domínios e reagregação de proteínas (Holt 2000; Horokhovatskyi *et al.*, 2016).

No nosso estudo houve diferenças na composição lipídica do sêmen descongelado entre os tratamentos independente da solução crioprotetora utilizada. Quando a solução 1 foi utilizada foi observada diferença ($p < 0,05$) para os ácidos C18:0, C18:2n6 (LA), C18:4n3, C20:4n6, C22:5n3, MUFA, PUFAs totais e PUFAs-n3, sendo a maioria destes encontrados em maior porcentagem no tratamento com 6% de OPM, no entanto isso não influenciou na crio-resistência dos espermatozoides visto que não houve diferença para a maioria dos parâmetros cinético (MOT, PRG, Sptz médios e lentos, VCL, LIN, STR, WOB, ALH e BCF), integridade de membrana e fertilização entre os tratamentos após descongelamento. Em truta arco-íris também não foram verificadas diferenças significativas para os parâmetros de motilidade e fertilidade, quando foram adicionados ácidos graxos (araquidônico, araquídico, linoléico ou ácido palmítico) a solução crioprotetora (Lahnsteiner *et al.*, 2009). Apesar disso Mansour *et al.* (2011) verificaram que para *Salvelinus alpinus* o ácido docosapentaenóico (C22:5n3) e o total PUFAs-n3 estão correlacionados positivamente com a fertilização.

Quando utilizada a solução 2 no congelamento do sêmen de *A. lacustris* foi verificada diferença ($p < 0,05$) para os ácidos C18:0, C20:3n6, C20:4n6 (ARA), PUFAs totais, PUFAs-n3 e n6, sendo o tratamento sem inclusão de OPM o que possui menores porcentagens para maioria destes ácidos e que teve maiores valores para os parâmetros cinéticos após a descongelação, além disso o tratamento com os piores valores para os parâmetros cinéticos pós descongelação foi o que teve a maior porcentagem de ARA. Este resultado difere do obtido para *Cyprinus carpio* (Horokhovatskyi *et al.*, 2016) em espermatozoides caracterizado com maior crio-resistência continham uma porcentagem de ARA,

PUFAs totais e PUFAs-n6 significativamente maior naqueles espermatozoides considerados menos crioresistentes. No entanto essas diferenças entre os tratamentos quanto a esses ácidos não afetaram a integridade da membrana e fertilização após a descongelação.

Quando avaliada a diferença entre as soluções para cada tratamento, o tratamento com 9% de OPM foi o único que afetou os parâmetros cinéticos (MOT, PRG, Sptz lentos, VCL, ALH, BCF) e fertilização após o descongelamento com melhores resultados utilizando a solução 1, o que pode demonstrar que mesmo não havendo diferença para composição lipídica entre as soluções neste tratamento, a maior porcentagem de ácido docosapentaenóico (C22:5n3), PUFAs totais, PUFAs-n3 e n6 com a utilização da solução 1 pode ter influenciado nos parâmetros avaliados, visto que já foi relatado em outros estudos influência positiva destes na motilidade e fertilização em peixes (Mansour *et al.*, 2011; Horokhovatskyi *et al.*, 2016)

Além disso em todos os tratamentos para ambas as soluções o processo de criopreservação ocasionou mudança na composição de lipídica do sêmen com um aumento expressivo da porcentagem de PUFAs totais e PUFAs-n3 e n6 em relação ao sêmen fresco. Diversos estudos já demonstraram que a membrana dos espermatozoides é suscetível ao processo de criopreservação, ocasionando mudanças na organização de fosfolipídios, colesterol e proteínas, alterando assim a homeostase celular e consequentemente causando danos na função espermática (Müller *et al.*, 2008; Martinez-Páramo *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2019; Díaz *et al.*, 2019; Díaz *et al.*, 2021)

A fertilização não foi influenciada pela inclusão de OPM o que demonstram que o protocolo de criopreservação utilizado manteve a viabilidade do sêmen após o descongelamento, sendo a maior taxa de fertilização foi obtida no tratamento com 6% de OPM e utilizando a solução 1. Em *Oncorhynchus mykiss* a utilização de diferentes fontes de lipídios na dieta também não afetou a taxa de fertilização. Já para *Salmo trutta macrostigma* a adição do PUFA (DHA) na solução crioprotetora aumentou a taxa de fertilização em comparação com o controle, no entanto está taxa foi significativamente inferior ao sêmen fresco (Pustowka *et al.*, 2000; Bozkurt, Yavaş, 2021).

De acordo com Vassallo-Agius *et al.* (2001) uma maior porcentagem de PUFAs-n3 nos espermatozoides reflete em maior taxa fertilização, fato verificado neste estudo em que no tratamento que obteve a maior taxa fertilização (6% de OPM – solução 1) o sêmen possuía maior quantidade PUFAs-n3, assim como tratamento com menor taxa de fertilização para a solução 1 (9% de OPM), tinha a menor porcentagem de PUFAs-n3, além disso o tratamento com 6% de OPM possuía significativamente maior porcentagem de PUFAs totais que o tratamento com 9% de OPM. Também já foi relatado para *Salvelinus alpinus* que espermatozoides com maior fertilidade continha maior teor de PUFAs-n3 nos espermatozoides (Mansour *et al.*, 2011).

No entanto efeito contrário é observado quando comparado os resultados obtidos com a solução 2 entre os tratamentos, no qual a maior taxa de fertilização é obtida no tratamento sem inclusão de OPM, que é caracterizado por ter a menor porcentagem de PUFAs-n3, mas o tratamento com 9% de OPM também teve a menor taxa de fertilização entre os tratamentos para a solução 2. Porém este resultado poderia ser explicado porque o tratamento sem inclusão de OPM teve valores maiores para os parâmetros cinéticos dos espermatozoides para esta solução visto que a motilidade e a velocidade dos espermatozoides são parâmetros correlacionados com a fertilização (Cabrita *et al.*, 2010; Gallego *et al.*, 2013).

Quando comparadas as soluções e sêmen fresco dentro de cada tratamento, apenas o tratamento com 9% de OPM foi influenciado, sendo que o sêmen fresco teve taxa de fertilização menor que a solução 1. Essa melhor taxa de fertilização obtida com a solução 1 pode ser atribuída a maior quantidade de PUFAs totais e PUFAs-n3 nos espermatozoides descongelados quando comparado a solução 2 apesar de não haver diferença significativa entre as soluções, essa porcentagem de PUFAs também era maior a encontrada no sêmen fresco deste tratamento. Assim como já relatado para *Salvelinus alpinus* e *Oncorhynchus mykiss* que em maiores porcentagens de PUFAs-n3 resultaram em maior fertilidade do sêmen (Lahnsteiner, *et al.*, 2009; Mansour *et al.*, 2011).

CONCLUSÕES

Assim podemos concluir a inclusão de PUFAs-ô3 na dieta de machos reprodutores influenciou negativamente os parâmetros seminais. A crioresistência do sêmen foi influenciada pela composição de ácidos graxos, uma vez que melhoraram a integridade da membrana e capacidade de fertilização dos espermatozoides criopreservados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, J. Y.; PARK, J. Y.; LIM, H. K. Effects of different diluents, cryoprotective agents, and freezing rates on sperm cryopreservation in *Epinephelus akaara*. **Cryobiology**, v. 83, p. 60–64, 2018.
- BAI, C.; KANG, N.; ZHAO, J.; DAI, J.; GAO, H.; CHEN, Y.; DONG, H.; HUANG, C.; DONG, Q. Cryopreservation disrupts lipid rafts and heat Shock proteins in yellow catfish sperm. **Cryobiology**, v. 87, p. 32–39, 2019.
- BEIRÃO, J.; SOARES, F.; POUSÃO-FERREIRA, P.; DIOGO, P.; DIAS, J.; DINIS, M. T.; HERRÁEZ, M. P.; CABRITA, E. The effect of enriched diets on *Solea senegalensis* sperm quality. **Aquaculture**, v. 435, p. 187-194, 2015.
- BEST, B. P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, p. 422-436, 2015.
- BHATTACHARYA, S.; PRAJAPATI, B. G. A Review on Cryoprotectant and its Modern Implication in Cryonics. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 10(3), p. 154-158, 2016.
- BOZKURT, Y.; YAVAŞ, I. Effect of supplementations of docosahexaenoic acid (DHA) into a Tris-glucose based extender on the post-thaw sperm quality, fertility and hatching rates in brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) following cryopreservation. **International Aquatic Research**, v. 13, p. 147-154, 2021.
- BRAMBILA-SOUZA, G.; MYLONAS, C. C.; DE MELLO, P. H.; KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R.; TOLUSSI, C. E.; MOREIRA, R. G. GnRH α implants and temperature modulate Lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) induced reproduction out of the reproductive season. **Aquaculture Research**, v. 52 (11), p. 5595-5605, 2021.
- CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; GAVAIA, P. J.; RIESCO, M. F.; VALCARCE, D. G.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P.; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, p. 432, p. 389–401, 2014.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Review article cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623–635, 2010.
- CARNEIRO-LEITE, L.; BASHIYO-SILVA, C.; OLIVEIRA, Y. A. A.; BORGES, L. P.; SANCHEZ, M. P.; SILVA, L. G.; LOBATO, S. I. R.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA A. Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethylsulfoxide and methylglycol. **Neotropical Ichthyology**, v. 18 (3), p. 1-20, 2020.
- CARVALHO, A. F. S. **Criopreservação de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*): predição do potencial de congelabilidade e uso da cafeína na solução ativadora**. Dissertação.

Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CHATIZA, F. P.; PIETERSE, G. M.; BARTELS, P.; NEDAMBALE, T. L. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. **Animal Reproduction Science**, v. 126, p. 234– 244, 2011.

CONTRERAS, P.; DUMORN, K.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; MERINO, O.; FIGUEROA, E.; FARÍAS, J. G.; VALDEBENITO, I.; RISOPATRÓN, J. Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–17, 2019.

COSTA, B. B.; MARQUES, L. S.; LASSEN, P. G. RODRIGUES, R. R.; STREIT-JR, S. P. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, p. 987-993, 2019.

COSTA, B. B.; OLIVEIRA, D. L.; RODRIGUES, R. B.; GOMES, I. C.; STREIT-JR, D. P. Morphological abnormalities in zebrafish cryopreserved sperm. **Cryobiology**, p. 97, p. 235–237, 2020.

DADRAS, H.; SAMPELS, S.; GOLPOUR, A.; DZYUBA, V.; COSSON, J.; DZYUBA, B. Analysis of common carp *Cyprinus carpio* sperm motility and lipid composition using different in vitro temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 180, p. 37-43, 2017.

DHANASEKAR, K.; SELVAKUMAR, N.; MUNUSWAMY, N. Cryopreservation of sperm in cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). **Aquaculture**, v. 557, p. 738313, 2022.

DÍAZ, R.; LEE-ESTEVEZ, M.; QUIÑONES, J.; DUMORNÉ, K.; SHORT, S.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; VALDEBENITO, I.; SEPÚLVEDA, N.; FARÍAS, J. G. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm morphology and membrane lipid composition related to cold storage and cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 204, p. 50–59, 2019.

DÍAZ, R.; QUIÑONES, J.; SHORT, S.; CONTRERAS, P.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; CARCINO-BAIER, D.; SEPÚLVEDA, N.; VALDEBENITO, I.; FARÍAS, J. G. Effect of exogenous lipids on cryotolerance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 98, p. 25-32, 2021.

ELLIOT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74-91, 2017.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; MERINO, O.; UBILLA, A.; RISOPATRÓN, J.; FARIAS, J. G. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. **Journal of Fish Biology**, v. 89 (3), p. 1537-1550, 2016.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B. A.; VALENTI, W.C. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, p. 2-16, 2017

FRANÇA, T. S.; GOMES, I. C.; SANCHES, E. A.; ATEHORTÚA, M. P.; TEIXEIRA, N. S.; RODRIGUES, R. B.; FREITAS, T. R.; GALUPPO, A. G.; QUIRINO, M.; BENATO, J. L.; MACHADO, T. L. F.; MARQUES, L. S.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; BORTOLOZZO, F. P.; STREIT-JR, D. P. Post-thaw dilution of *Rhamdia quelen* sperm improves the reproductive success. **Animal Reproduction Science**, v. 243, p. 107018, 2022.

FUJIMOTO, T.; KANEYASU, T.; KOGAME, Y.; NYNCA, J.; CIERESZKO, A.; TAKAHASHI, E.; YAMAHA, E.; NARUSE, K.; ARAI, K. Cryopreservation of masu salmon sperm using glucose-methanol extender and seminal plasma biomarkers related to post-thaw sperm motility. **Aquaculture**, v. 557, p. 738305, 2022.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoamotility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). **Aquaculture**, v. 416-417, p. 238-243, 2013.

GONÇALVES, L. U.; FERROLI, F.; VIEGAS, E. M. M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1967-1974, 2012.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOROKHOVATSKYI, Y.; SAMPELS, S.; COSSON, J.; LINHART, O.; RODINA, M.; FEDOROV, P.; BLECHA, M.; DZYUBA, B. Lipid composition in common carp (*Cyprinus carpio*) sperm possessing different cryoresistance. **Cryobiology**, v. 73, p. 282-285, 2016.

IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, p. 25-42, 2001.

JANG, T. H.; PARK, S. C.; YANG, J. H.; KIM, J. Y.; SEOK, J. H.; PARK, U. S.; CHOI, C. W.; LEE, S. R.; HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, p. 6, 12-18, 2017.

KLAIWATTANA, P.; SRISOOK, K.; SRISOOK, E.; VUTHIPHANDCHAI, V.; NEAMVONK, J. Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 15(1), p. 157-169, 2016.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. **Aquaculture**, v. 298, p. 118-124, 2009.

- LASSEN, P. G.; CANOZZI, M. E. A.; COSTA, B. B.; BARCELLOS, J. O. J.; STREIT-JR, D. Cryopreserved semen motility of south american neotropical fish: a meta-analysis. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 30, p. 19-32, 2022.
- LASSEN, P. G.; CANOZZI, M. E. A.; COSTA, B. B.; BARCELLOS, J. O. J.; STREIT-JR, D. P. Morphological abnormalities in cryopreserved semen from South American neotropical fish: A meta-analysis. **Aquaculture Research**, v. 00, p. 1–10, 2021.
- LI, J.; LIU, Q.; ZHANG, S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 24, p. 370-377, 2006.
- LOPES, J. T.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; NASCIMENTO, R. V.; FERREIRA, Y. M.; MONTENEGRO, A. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Efeito de vitaminas e aminoácidos como suplementação da solução crioprotetora para a criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p.1593–600, 2018.
- LÓPEZ, D. I.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition and osmolality affects post-thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 114–118, 2015.
- MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; McNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F.; PELLETIER, C. S. Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. **Aquaculture**, v. 318, p. 371–378, 2011.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; HERRÁEZ, M. P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, v. 131, p. 211– 218, 2012.
- MAULIDA, S.; ERIANI, K.; FADLI, N.; KOCABAS, F. K.; SITI-AZIZAH, M. N.; WILKES, M.; MUCHLISIN, Z. A. Effect of type and concentration of cryoprotectant on the motility, viability, and fertility of climbing perch *Anabas testudineus* Bloch, 1792 (Pisces: Anabantidae) sperm. **Theriogenology**, v. 201, P. 24-29, 2023.
- MEDINA-ROBLES, V. M.; GUAJE-RAMÍREZ, D. N.; MARIN-COSSIO, L. C.; SANDOVAL-VARGAS, L. Y.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. **Meta. Colombia**, v. 23, p. 15-24, 2019.
- MEDINA-ROBLES, V. M.; SANDOVAL-VARGAS, L. Y.; SUÁREZ-MARTÍNEZ, R. O.; GÓMEZ-RAMÍREZ, E.; GUAJE-RAMÍREZ, D. N.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryostorage of white cachama (*Piaractus orinoquensis*) sperm: Effects on

cellular, biochemical and ultrastructural parameters. **Aquaculture Reports**, v. 29, p. 101477, 2023.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; COSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-187, 2011.

MOTTA, N. C.; EGGER, R. C.; MONTEIRO, K. S.; OLIVEIRA, A. V.; MURGAS, L. D. S. Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, v. 179, p. 14-21, 2022.

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology Of Reproduction**, v. 78, p. 390–399, 2008.

NAVARRO, R. D.; NAVARRO, F. K. S. P.; FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, M. M. Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis* spp.) fed diet with different oil sources. **Acta Scientiarum**, v. 36, p. 399-404, 2014.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and column vapor. **Boletim do Instituto de Pesca (Impresso)**, v. 28, p. 135-139, 2002.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 207-218, 2004.

PARRISH, C. C.; NICHOLS, P. D.; PETHYBRIDGE, H.; YOUNG, J. W. Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator connections. **Oecologia**, v. 177, p. 85-95, 2015.

PERRY, C. T.; CORCINI, C. D.; ANCIUTI, A. N.; OTTE, M. V.; SOARES, S. L.; GARCIA, J. R. E.; MUELBET, J. R. E.; VARELA-JUNIOR, A. S. Amides as cryoprotectants for the freezing of Brycon orbignyanus sperm. **Aquaculture**, v. 508, p. 90–97, 2019.

PINHEIRO, J. P. S.; MELO-MACIEL, M. A. P.; LINHARES, F. R. A.; LOPRES, J. T.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; PINHEIRO, R. R. R.; TORRES, T. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Use of glucose or BTS™ combined with DMSO or methylglycol under two different freezing protocols for the cryopreservation of sperm from the common curimatã (*Prochilodus brevis*). **Animal Reproduction**, v.13, p.779-786, 2016.

PUSTOWKA, C.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F.; LALL S. P. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow

trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. **Aquaculture Research**, V. 31(3), P. 297-305, 2000.

ROCHA, N. A.; SCHADE, G. M.; ALVES, Á. M.; SILVA, C. S.; NAKIRIMOTO, J. M.; LAURI, L. S.; CAMPOS, L. G.; SANTOS, M. G.; MESQUITA, N. N.; RELVAS, R. S.; CARNEVALE, R. F.; OH, S. Y.; GAIA, V. P. D.; KIDA, V. R.; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O.D.; SENHORINI, J. A.; SIQUEIRA, H. O.; NASCIMENTO, N. F.; SILVA, L. A.; LÁZARO, T. M.; VISINTIN, J. A.; MONZANI, P. S.; YASUI, G. S. Acute exposure to hyperosmotic conditions reduces sperm activation by urine in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*, a freshwater teleost fish. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57(3), p. 1-8, 2020.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo amarelo em Monte Castelo/ SP: um estudo de caso. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 3, p.307-315, 2011.

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

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; PINHEIRO, J. P. S.; ALMEIDA, P. S.; LOPES, J. T.; LEITE, L. V. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, p. 343-350, 2014.

SAMAE, S. M.; MATEGHI, N.; ESTÉVEZ, A. Zebrafish as a Model to Screen the Potential of Fatty Acids in Reproduction. **Zebrafish**, v. 00, p. 1-18, 2018.

SANDOVAL-VARGAS, L.; JIMÉNEZ, M. S.; GONZÁLEZ, J. R.; VILLALOBOS, E. F.; CABRITA, E.; ISLER, I. V. Oxidative stress and use of antioxidants in fish sêmen cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, p. 365-387, 2021.

STEVANATO, D. J.; OSTRENSKY, A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical ichthyology**, v. 16, p. 1-10, 2018.

STREIT-JUNIOR, D. P.; OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M. DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35(2), p. 159 - 167, 2009.

STREIT-JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; VARGAS, L. D. M.; WATANABE, A. L. Qualitative parameters of the piapara sêmen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68 (3), p. 373-377, 2008.

TORRES, T. M.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V.; PEREIRA, V. A.; FERREIRA, Y. M.; LOBATO, J. S.; PINHEIRO, R. R. R.;

SALES, Y. S.; MONTENEGRO, A. R.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using different concentrations of non-permeable cryoprotectants. **Animal Reproduction**, v. 19, p. 1-12, 2022.

VASSALLO-AGIUS, R.; WATANABE, T.; YOSHIZAKI, G.; SATOH, S.; TAKEUCHI, Y. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed na n-3 essential fatty acid-deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. **Fisheries Science**, v. 67, p. 818–827, 2001.

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, v. 78, p. 361-368, 2012.

XIN, M.; CHENG, Y.; RODINA, M.; TUČKOVÁ, V.; SHELTON, W. L. Improving motility and fertilization capacity of low-quality sperm of sterlet *Acipenser ruthenus* during storage. **Theriogenology**, v. 156, p. 90-96, 2020.

XIN, M.; NIKSIRAT, H.; SHALIUTINA-KOLESOVÁ, A.; SIDDIQUE, M. A.; STERBA, J.; BORYSHPOLETS, S.; LINHART, O. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-16, 2019.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9(3), p. 464–70, 2015.