



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALIA GONÇALVES LEITE

**QUALIDADE ESPERMÁTICA DO JUNDIÁ AMAZÔNICO
(*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) EM DIFERENTES
TEMPOS E TEMPERATURAS**

Londrina
2021

NATALIA GONÇALVES LEITE

**QUALIDADE ESPERMÁTICA DO JUNDIÁ AMAZÔNICO
(*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) EM DIFERENTES
TEMPOS E TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em 2021 da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em ciência animal.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera-Barrero

Co-orientador: Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

226 LEITE, NATALIA GONÇALVES .
QUALIDADE ESPERMÁTICA DO JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) EM DIFERENTES TEMPOS E TEMPERATURAS / NATALIA GONÇALVES LEITE. - Londrina, 2021.
53 f. : il.

Orientador: Nelson Mauricio Lopera Barrero.
Coorientador: Jayme Aparecido Povh.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Análise espermática computadorizada de peixe. - Tese. 2. Efeito da temperatura no armazenamento seminal do *Leiarius marmoratus* - Tese. I. Lopera Barrero, Nelson Mauricio. II. Povh, Jayme Aparecido . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 636

NATALIA GONÇALVES LEITE

QUALIDADE ESPERMÁTICA DO JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) EM DIFERENTES TEMPOS E TEMPERATURAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em 2021 da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio
Lopera-Barrero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Melanie Digmayer
ITPAC Porto Nacional

Prof. Dra. Sandra Galbeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2021.

***Pense grande, voe bem alto...
Afinal, o sonho é "A realidade de um desejo reprimido."***

Lucas Coelho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por sua infinita bondade e cuidado em cada detalhe em minha vida, Ele é um Deus que realiza sonhos, colocou pessoas que me ajudaram a subir este degrau, nunca estive só, pois na sua infinita misericórdia supriu todas as necessidades e com sua infinita graça me surpreende e sustenta.

Agradeço aos meus pais Sergio Gonçalves Leite e Cláudia Rejane Soares Leite, sem vocês em minha vida não teria conseguido, seu apoio foi essencial, obrigada por acreditar e investir em meu sonho, aos meus familiares agradeço cada palavra de incentivo.

Agradeço ao meu orientador Nelson Mauricio Lopera Barrero, obrigada pelos conhecimentos transferidos, pelas oportunidades que me deste, e principalmente por ter me aceitado como orientanda.

Aos Professores e alunos que contribuíram neste projeto, em especial o Prof. Dr. Jayme Pohv (UFMS) e Prof. Dr. Eduardo Sanches (UNESP), e aos Alunos da pós graduação e graduação da UFMS e UFRS.

Aos órgãos financiadores deste projeto: CAPES pelo auxílio financeiro e a piscicultura comercial por ter cedido o espaço e os animais.

LEITE, Natalia Gonçalves. **Qualidade espermática do jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) em diferentes tempos e temperaturas.** 2021. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo e temperaturas de armazenamento sobre a qualidade espermática no sêmen do *Leiarius marmoratus* in natura. Um peixe de couro proveniente da bacia dos rios Amazonas, Orinoco e Eussebio, de grande importância na piscicultura nacional por conta da sua utilização na hibridização intergenérica. O sêmen proveniente de cinco reprodutores foi distribuído em um delineamento experimental em esquema fatorial (2x4). Os fatores foram constituídos pela temperatura ambiente e resfriado, e os tempos de exposição: 0 (controle), 12, 20 e 28 horas pós-coleta. Avaliaram-se os seguintes parâmetros espermáticos do sêmen: Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VMD), velocidade em linha reta (VLR), retilinearidade (RET), oscilação (OSC), progressão (PROG), frequência de batimento cruzado (FBC), taxa de espermatozoides normais (NOR) e taxa de sobrevivência (SOB). Os parâmetros VCL, VMD e VLR foram agrupados para formação da velocidade espermática (VE) através da análise de componentes principais. A MOT, RET, NOR e SOB tiveram efeito do tipo de armazenamento e do tempo ($P < 0,05$), a FBC teve efeito do tempo ($P < 0,05$). A melhor qualidade espermática foi observada imediatamente após a coleta. O sêmen refrigerado se manteve com boa viabilidade, 58,58% de motilidade apesar de estar armazenado por 28 horas. No armazenamento em temperatura ambiente foi observada uma viabilidade espermática até as primeiras 12 horas com motilidade satisfatória de 64,20%. Sugere-se, caso haja a necessidade de estocagem de sêmen por um curto-período, que seja realizado em ambiente refrigerado ou em temperatura ambiente por no máximo 12 horas.

Palavras-chave: análise espermática computadorizada; reprodução; peixe nativo; siluriforme; qualidade espermática.

LEITE, Natalia Gonçalves. **Spermatic quality of the amazon jundiá (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) at different times and temperatures.** 2021. 53 p. Dissertation (Master's in Scienca Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different times and temperatures on the sperm quality in the semen of the *Leiarius marmoratus* in natura. A leather fish from the Amazon, Orinoco and Eussebio rivers basin, of great importance in national fish farming due to its use in intergeneric hybridization. The semen from five breeders was distributed in a factorial design (2×4). The factors were constituted by the ambient temperature and the cold, and the exposure times: 0 (control), 12, 20 and 28 hours after collection. The following spermatic parameters of semen were evaluated: motility rate (MOT), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) straight line velocity (VSL), straightness (STR), progression (PROG), cross-beat frequency (BCF) the proportion of normal spermatozoa (NOR) and survival (SOB). The VCL, VAP and VSL were grouped to formation of sperm velocity (SV) by principal components analysis. The MOT, STR, NOR and SOB had the effect of storage type and time ($P<0.05$), the BCF had the effect of time ($P<0.05$). The refrigerated semen remained with good viability, 58.58% of motility despite being stored for 28 hours. In storage at room temperature, sperm viability was observed up to the first 12 hours with satisfactory motility of 64.20%. It is suggested, in case there is a need to store semen for a short period, that it be carried out in a refrigerated environment or at room temperature for a maximum of 12 hours.

Key-words: computerized sperm analysis; reproduction; native fish; siluriform; sperm quality.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Ilustração Jundiá Amazônico - *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870).15

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Survival sperm rate (A) and normal semen rate (B) of *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.....38
- Gráfico 2** – Effect of four time periods on mean motility rate for two types of storage of semen of *Leiarius marmoratus*..40
- Gráfico 3** – Effect of storage type and time on sperm straightness in *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.....40
- Gráfico 4** – Effect of time on cross-beat frequency in semen of *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Settings used in CASA/ImageJ plugin dialog box to evaluate sperm parameters for *Leiarius marmoratus* with video recorded on a 40x objective at 100 fps (656 × 490 pixels). Settings for evaluating 10 s of video or 1000 frames.....36
- Tabela 2** – Data on sires used for collection, seminal volume released, and sperm concentration.....38
- Tabela 3** – Seminal parameters observed in CASA for *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.39
- Tabela 4** – Sperm velocity of *Leiarius marmoratus* after exposure of in natura semen to two storage environments for different time periods.42

ANEXO

- Tabela 1** – Parâmetros espermáticos observados em *Leiarius marmoratus* imediatamente após coleta do sêmen.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| MOT | Taxa de motilidade |
| VCL | Velocidade curvilínear |
| VMD | Velocidade média de deslocamento |
| VLR | Velocidade em linha reta |
| RET | Retilinearidade |
| OSC | Oscilação |
| PROG | Progressão |
| FBC | Frequência de batimento cruzado |
| NOR | Taxa de espermatozoides normais |
| TSOB | Taxa de sobrevivência |
| VE | Velocidade espermática |
| CASA | Computer assisted sperm analysis |
| EHC | Extrato de hipófise de carpa |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| FAO | Organização para a alimentação e agricultura |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 | LEIARIUS MARMORATUS (GILL, 1870)..... | 15 |
| 2.2 | REPRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS..... | 17 |
| 2.3 | CARACTERÍSTICAS DE SÊMEN DE PEIXES..... | 18 |
| 2.4 | CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES..... | 20 |
| 2.5 | COMPUTER-ASSISTED SPERM ANALYSIS (CASA) NA AVALIAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXE | 21 |
| 3 | REFERÊNCIAS | 23 |
| 4 | HIPÓTESE | 29 |
| 5 | OBJETIVOS | 30 |
| 5.1 | OBJETIVO GERAL | 30 |
| 5.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| 6 | ARTIGO – Qualidade espermática do Jundiá Amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i> GILL, 1870) submetido a diferentes tempos e temperaturas. | 31 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 51 |
| 8 | ANEXO | 52 |

1 INTRODUÇÃO

Segundo a estimativa da FAO a produção global de peixes atingiu cerca de 179 milhões de toneladas em 2018. O consumo mundial de peixes per capita atingiu um novo recorde de 20,5 kg por ano e deve aumentar ainda mais na próxima década, principalmente em razão da expansão da oferta de produtos aquícolas (FAO, 2020). No cenário nacional a piscicultura brasileira está avançando, sendo que nos últimos seis anos a produção cresceu 31%. Dentro deste crescimento os peixes nativos vêm ganhando destaque, participando com 38% da produção, apesar de sua produção enfrentar dificuldades em 2019 deixando sua produção estável (PEIXE BR, 2020).

Leiarius marmoratus (Siluriformes: Pimelodidae) é um bagre nativo das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Essequibo (LASSO *et al.* 2011). Tem grande importância para a piscicultura brasileira, principalmente por sua exploração comercial no cruzamento interespecífico com *Pseudoplatystoma sp.* (NARRARO; PIVATO, 2016). Seu comportamento reofílico, torna a reprodução em cativeiro mais vulnerável, apresentando disfunções reprodutivas, com pequena quantidade de sêmen obtida (CREPALDI *et al.* 2006; MIRA-LOPEZ *et al.*, 2010). Sem os estímulos naturais, não ocorre a completa maturação gonadal, necessitando de um estímulo exógeno com uso de indutores hormonais (DALMMAS *et al.*, 2016; RIZZO; BAZZOLI, 2014).

Para a indução hormonal ocorrer, necessita-se de uma pré-seleção dos reprodutores, de acordo com suas características de maturidade sexual. O indutor mais utilizado é o extrato bruto de hipófise de carpa. De forma geral, em fêmeas são utilizadas duas dosagens, 1ª de 0,5 mg/kg 12h antes da 2ª com 5 mg/kg. Nos machos aplica-se uma dose única de 2-3 mg/kg na ocasião da 2ª dose da fêmea. A reprodução artificial dos peixes nativos ainda é realizada no método a “seco”, onde se extrai os gametas, misturando-os e homogeneizando-os na ausência de água, sendo acrescentada em seguida para a ativação dos espermatozoides e fecundação dos ovócitos (SANCHES, 2012, apud IHERING; AZEVEDO, 1936).

A ativação espermática ocorre quando o espermatozoide entra em contato com o meio aquático, ativando a motilidade (MARQUES, 2001), durante a reprodução natural ou com soluções específicas na reprodução artificial (COSSON, 2016; FIGUEROA *et al.* 2014). Inicialmente as velocidades espermáticas são mais altas, e vão reduzindo gradativamente (COSSON, 2010; COSSON, 2016).

A qualidade espermática é uma característica essencial para um bom processo reprodutivo (GALO *et al.* 2014). Sua avaliação consiste em analisar características físicas do sêmen (motilidade, volume, concentração e vigor) além da velocidade, a motilidade está relacionada com a energia armazenada nos espermatozoides (COSSON, 2010; DZYUBA *et al.* 2017). Baseado na hipótese que o espermatozoide perde qualidade ao longo do tempo após a coleta, são aplicados métodos de estocagem que garantam a longevidade, proporcionando a otimização do uso dos reprodutores e aumentando a eficiência dos procedimentos empregados na propagação artificial (SANCHES, 2012).

A técnica de resfriamento seminal em curto prazo para a conservação de sêmen de peixes é uma prática bastante antiga. Promove a conservação das características seminais por horas ou até dias, permitindo a utilização do sêmen no momento mais adequado da reprodução. Uma vez que tem menor custo em relação às técnicas de congelamento e não necessita do uso do crioprotetor (BARBOSA, *et al.* 2017).

O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um software utilizado na análise espermática, com finalidade de visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas. Dentro das vantagens desse sistema está a quantificação de um grande volume de células com padrão heterogêneo em um pequeno espaço de tempo (KRAEMER *et al.*, 1998). O software indica a quantidade de espermatozoides que apresentam movimentos progressivos, ou não progressivos, velocidade espermática, linearidade, retilinearidade, oscilação, progressão, frequência de batimentos e número de espermatozoides (RAVINDER *et al.* 1997; RURANGWA *et al.* 2001; WILSON-LEEDY; INGERMANN 2007; SANCHES, 2011b).

Com base nessas informações, objetivou-se neste trabalho analisar a qualidade espermática computadorizada do *L. marmoratus* no armazenamento refrigerado e na temperatura ambiente em quatro tempos diferentes no decorrer de 28 horas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEIARIUS MARMORATUS (GILL, 1870)

Leiarius marmoratus, conhecido com o nome popular Jundiá amazônico, peixe tigre ou Yaque, é um bagre (peixe de couro) de água doce de grande importância para a piscicultura brasileira, principalmente por sua exploração comercial na produção de linhagens híbridas (NARRARO; PIVATO, 2016). Sua coloração varia nos tons de marrom com manchas pretas circulares, nadadeira caudal bifurcada, peso médio de cinco quilos, podendo chegar até 60 cm de comprimento (Figura 1) (LASSO *et al.* 2011).

Reino - Animalia

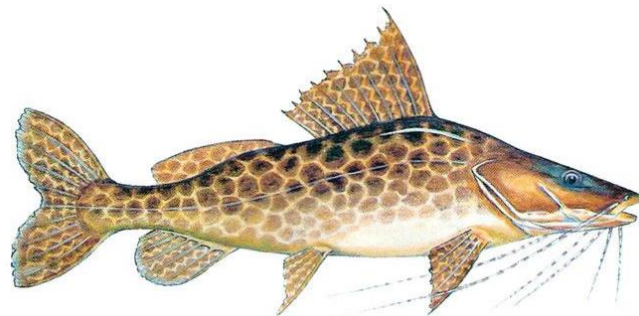
Filo - Chordata

Classe - Actinopterygii

Ordem - Siluriformes

Família – Pimelodidae

Gênero - *Leiarius* Bleeker, 1862



Fonte: Lester

Figura 1. Ilustração Jundiá Amazônico - *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870).

Da ordem Siluriformes e família *Pimelodidae*, foi classificado por Sciades Marmoratus Gill 1870 (REIS *et al.* 2003). Com ampla distribuição nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Essequibo (Figura 2), adaptado à temperatura média de 25° C, apresenta comportamento reofílico. São animais onívoros, com tendência carnívora, alimentando-se de insetos, material vegetal e peixes. Possui maior atividade nos primeiros horários da manhã, ao anoitecer e á noite, durante o dia tem hábito de se

ocultar sob troncos, pedras e galhos. (LASSO *et al.* 2011).

Sua carne é muito apreciada, possuindo a característica dos siluriformes de não apresentar espinhos intermusculares em forma de “y” (OLIVEIRA, 2013). Esta espécie tem um papel importante na piscicultura, pois é amplamente utilizada para hibridização nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil na obtenção do híbrido Pintado amazônico, resultado do cruzamento com a fêmea do *Pseudoplatystoma sp.* (NAVARRO; PIVATO, 2016).

Seu comportamento reofílico, torna a reprodução em cativeiro mais vulnerável, apresentando disfunções reprodutivas. Nos reprodutores é caracterizada pelo baixo volume e qualidade do sêmen. Nas fêmeas essas falhas são caracterizadas por problemas na maturação final dos ovócitos, ovulação e na ovoposição (CREPALDI *et al.*, 2006).

Pesquisas relacionadas com aspectos reprodutivos, tais como; teste de crioprotetores de sêmen vem sendo estudado. Greller *et al.* (2019) avaliou diferentes concentrações de trealose, e encontrou resultado satisfatório na concentração de 100-200mM. Borges (2020) e Borges (2018) avaliou a estruturada dos espermatozoides e a sua criopreservação com três agentes crioprotetores (metanol 10%, DMSO 10% e etilenoglicol 10%) e duas soluções ativadoras (NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%), não encontrando resultado satisfatório para estabelecer um protocolo.

Também estudos da qualidade espermática vêm sendo realizados. Navarro e Pivato (2016) avaliaram características qualitativas e quantitativas do sêmen de jundiá amazônico onde mostrou-se adequado para uso em procedimentos de reprodução artificial. Galo *et al.* (2014) avaliaram a qualidade espermática após resfriamento (13 ± 2°C.) sem diluidor, observando um aumento na duração da motilidade, atingindo seu pico após três horas de armazenamento, já o sêmen fresco mostrou uma diminuição significativa na motilidade.

Outros assuntos como características e análise genética do *L. marmoratus* foram realizadas. Coelho *et al.* (2019) analisou e descreveu dados da ontogenia inicial de larvas e juvenis. Pandolfi *et al.* (2020) avaliou a transferibilidade de marcadores microssatélites heterólogos *L. marmoratus*.

Pesquisas diversas vem sendo realizadas por pesquisadores sobre o híbrido da espécie (pintado amazônico, cachandiá, jundiará). Oliveira e Almeida *et al.* (2014) avaliando o desempenho dos juvenis alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína bruta, observaram o melhor desempenho no uso de proteína bruta

com 45,75%. Lanzarin *et al.* (2016) objetivando desenvolver um método de índice de qualidade no híbrido eviscerado armazenado em gelo, observaram uma vida útil de 12 dias em gelo. Tavares *et al.* (2018) descreveu surtos de *Streptococcus spp.* no cultivo dos híbridos. Moura *et al.* (2017) realizou estudo investigativo sobre os efeitos do Roundup Original®, um herbicida à base de glifosato no estresse oxidativo do híbrido, mostrando que pode ser uma potencial ameaça à saúde e sobrevivência dos peixes no meio ambiente. Yabu *et al.* (2018) realizou um estudo para relatar a presença do híbrido na bacia do alto rio Paraná. Winters *et al.* (2016) descreveu o primeiro relato de infecção por *Pleistophora hyphessobryconis* um microsporídeo infectando o músculo esquelético do híbrido. Fortes-silva *et al.* (2017) estudou o comportamento alimentar: auto-seleção da fonte de proteína e ritmos de alimentação por demanda do híbrido em cativeiro. Lemos *et al.* (2018) testou os efeitos de diferentes níveis de pH sobre o desempenho de crescimento e variáveis bioquímicas no híbrido, onde o pH da água 4,56 é recomendado para um sistema de produção.

2.2 REPRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS

Os peixes nativos estão presentes em quase todo o território nacional, representando 38% da produção total de peixes no país no ano de 2019 (PEIXE BR, 2020). Problemas estruturais e sanitários, como a ocorrência de *Salmonella spp.* em peixes nativos (SANTOS *et al.* 2019) foram responsáveis pela instabilidade da produção que se mantém em expansão. Nesse contexto, são necessárias pesquisas para o aprimoramento da criação de algumas espécies, principalmente na reprodução em cativeiro (PEIXE BR, 2020).

Os peixes reofílicos são peixes que realizam a rota migratória para poderem se reproduzir, sendo que durante a migração o estímulo ambiental e o percurso viabilizam a maturação final das gônadas (DALMMAS *et al.* 2016). Dentre esses estímulos, os ambientais, principalmente a chuva, a temperatura e o fotoperíodo, atuam no hipotálamo induzindo a produção de fatores liberadores de gonadotrofinas, estimulando a liberação de hormônios gonadotróficos e a produção de esteroides sexuais, que são responsáveis pela maturação sexual (RIZZO; BAZZOLI, 2014).

Espécies migratórias quando mantidas em viveiro tem dificuldades de se reproduzem naturalmente. Sem os estímulos ambientais, não ocorre a desova e a espermiacção, necessitando de um estímulo exógeno, a indução hormonal, para que

as fêmeas atinjam a maturação final ovocitária e desova e os reprodutores a maturação final dos espermatozoides (DALMMAS *et al.* 2016; RIZZO; BAZZOLI, 2014).

Para a indução hormonal ocorrer, necessita-se de uma pré-seleção dos reprodutores, de acordo com suas características de maturidade sexual. As fêmeas devem apresentar ventre abaulado, papila genital intumescida e avermelhada. Por outro lado, nos machos deve se observar, através de uma pequena compressão abdominal, a liberação de pequenas quantias de sêmen (LIMA *et al.* 2013). O indutor mais utilizado é o extrato bruto de hipófise de carpa. De forma geral, em fêmeas são utilizadas duas dosagens, 1ª de 0,5 mg kg⁻¹ 12h antes da 2ª com 5,0mg kg⁻¹. Nos reprodutores por sua vez, se usa uma dose única 2-3mg/kg na ocasião da 2ª dose da fêmea.

2.3 CARACTERÍSTICAS DE SÊMEN DE PEIXES

O testículo dos peixes é geralmente um órgão duplo, alongado envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea. Devido a várias estratégias reprodutivas entre as espécies, o testículo pode apresentar alterações no tamanho, cor, forma e peso (BALDISSEROTTO *et al.* 2014). Os peixes da ordem Siluriformes normalmente apresentam testículo franjado com padrão tubular anastomosado e espermatogonial irrestrito (possui espermatogônia em toda extensão do túbulo seminífero) com número variado de estruturas visíveis ao olho nu. No *L. marmoratus* os testículos são pareados, digitiformes e estão localizados na cavidade celômica dorsalmente ao tubo digestivo e ventralmente ao rim e bexiga natatória, sendo do tipo espermatogonial irrestrito e tubular. Devido ao acúmulo de gordura e localização do testículo a extração do sêmen por extrusão manual é muito difícil (BALDISSEROTTO *et al.* 2014, MIRA; LÓPEZ *et al.* 2010; RAMÍREZ-GIL; AJIACO-MARTÍNEZ, 1997).

Os peixes teleósteos apresentam alterações morfológicas em sua gônada no decorrer do ciclo reprodutivo, cujas características são usadas para classificar os estádios de maturação gonadal, como: cor, peso, aspecto e presença de espermatozoides (BALDISSEROTTO *et al.* 2014). Os espermatozoides são pequenos (25 a 100 µm de comprimento e 2 µm de largura da cabeça) e de estrutura bem simples subdivididos em: cabeça, que contém o núcleo de cromatina compactada; peça intermediária, com mitocôndrias que atuam na produção de energia; e flagelo cujo número varia de

acordo da espécie, que atua na motilidade. A ausência do acrossomo nos peixes é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovócito, que facilita a penetração dos espermatozoides (COSSON *et al.* 1999, LAHNSTEINER; PATZNER, 2008, BOBE; LABBÉ, 2010; MELO *et al.* 2017).

Nos peixes siluriformes os espermatozoides são semelhantes, com cabeça pequena de formato esférico, com ausência de acrossoma, peça intermediária de formato variável, podendo apresentar vesículas ou não, e a cauda uniflagelada (QUAGIO-GRASSIOTTO; OLIVEIRA, 2008). Este formato de cabeça está relacionado com a estratégia reprodutiva de fecundação externa em ambientes demersais ou pelágicos, como no *L. mamoratus* (MELO *et al.* 2011).

Os espermatozoides de peixe de água doce são ativados quando entram em contato com a água ou com soluções específicas, sendo assim a fertilização dos ovócitos ocorrerá após a ativação da motilidade (MARQUES, 2001), durante a reprodução natural ou na reprodução artificial (COSSON, 2016; FIGUEROA *et al.* 2016). A ativação é realizada através da troca de íons entre a solução e o espermatozoide por meio de diferença osmótica, ocorrendo um influxo de água para dentro da célula, que posteriormente utilizam os íons de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} como gatilhos para liberação de energia conforme a espécie (BALDISSEROTTO *et al.* 2014). Inicialmente as velocidades espermáticas são mais altas, e vão reduzindo gradativamente, situação essa decorrente do gasto de trifosfato de adenosina (ATP), fonte de energia para a manutenção do movimento flagelar (COSSON, 2010; COSSON, 2016).

Entre as espécies de peixes existem variedades dentro das características seminais, e sua avaliação é importante para uma reprodução bem-sucedida (TREIN, 2018). A avaliação espermática consiste em analisar características físicas do sêmen (motilidade, volume, concentração e vigor). Além da velocidade, a duração da motilidade também está relacionada com a energia armazenada nos espermatozoides, sendo que o consumo inicial de energia não consegue ser suprido pela produção de ATP na mitocôndria (COSSON, 2010; DZYUBA *et al.* 2017). O número de mitocôndrias e o comprimento do flagelo poderiam explicar a causa das diferenças na duração da motilidade entre as espécies (ALAVI; COSSON, 2006; BOBE; LABBÉ, 2010). O conhecimento sobre estes valores é necessário para que seja possível a avaliação da qualidade do sêmen coletado, e com isso, aperfeiçoar os processos reprodutivos (ROUTRAY *et al.* 2007).

2.4 CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES

A conservação seminal de peixes tem como função preservar os gametas masculinos para a utilização em fertilização assistida. Por meio dela, procura-se resolver problemas tanto de ordem econômica, como atender ao mercado consumidor, quanto de ordem ecológica, visando a preservação de espécies de peixes super exploradas (SALMITO-VANDERLEY, 2016). Dessa forma, a conservação de sêmen torna-se importante não apenas para a conservação da diversidade genética em si, mas também pela necessidade de manutenção da variabilidade genética para os programas de melhoramento genético de espécies para cultivo (REZENDE; MARQUES 2009).

Dentre as técnicas de conservação seminal destacam-se o resfriamento e a criopreservação de gametas, sendo essas biotécnicas reprodutivas importantes ferramentas. Para o resfriamento seminal, o diluente irá diminuir a concorrência dos espermatozoides por oxigênio e espaço, e controle do crescimento bacteriano (CAROLSFELD; HARVEY, 1999), a não diluição pode afetar a duração da motilidade, o envelhecimento celular (Viveiros *et al.*, 2014). Os diluidores mais utilizados são: a glicose 5%, o BTS – Beltsville Thawing Solution®, a água de coco in natura e água de coco em pó – ACP-104 (SALMITO-VANDERLEY *et al.* 2016).

Na criopreservação, o uso da solução diluidora e do crioprotetor é imprescindível, pois muitos danos são ocasionados pela ação do frio durante esse processo. Sua função é proteger as células espermáticas dos efeitos deletérios provocados pela criopreservação. Devem possuir baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (BATISTA *et al.* 2006). São classificados como intracelulares ou de ação interna (dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etilenoglicol e metilglicol) e extracelulares ou de ação externa (gema de ovo e a sacarose) (SALMITO-VANDERLEY *et al.* 2016).

A técnica de resfriamento seminal em curto prazo para a conservação de sêmen de peixes é uma prática bastante antiga. Promove a conservação das características seminais por horas ou até dias, permitindo a utilização do sêmen no momento mais adequado da reprodução. Uma vez que tem menor custo em relação as técnicas de congelamento e não necessita do uso do crioprotetores, possibilita o resfriamento em temperaturas de 1-15°C (BARBOSA *et al.* 2017). Os fatores que determinam o sucesso dessa técnica é a redução da temperatura, o fornecimento e a

troca de gases com o meio, e a prevenção do desenvolvimento bacteriano e da dessecação (SALMITO-VANDERLEY *et al.* 2016).

A criopreservação é uma técnica que utiliza temperaturas extremamente baixas para manter a estrutura e funcionalidade do sêmen, conservando-os estrutural e geneticamente viáveis e temporariamente inativos do ponto de vista metabólico e funcional (REZENDE; MARQUES, 2009).

2.5 COMPUTER-ASSISTED SPERM ANALYSIS (CASA) NA AVALIAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXE

A análise dos parâmetros de qualidade do sêmen, entre eles, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático, tem sido realizada de forma subjetiva há anos (GALLEGO; ASTURIANO, 2018; VIVEIROS *et al.* 2010; SANCHES *et al.* 2009; MATOS *et al.* 2008). Entretanto, com o avanço da tecnologia, esta técnica está sendo substituída por outras mais precisas e objetivas (NEUMANN, 2019), como o CASA, que foi desenvolvido em meados da década de 80 (MORTIMER, HORST; MORTIMER, 2015; AMANN; WABERSKI, 2014). O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um software utilizado na análise espermática, com finalidade de visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas. Os sistemas utilizam computadores para capturar digitalmente uma sequência de imagens de vídeo através de uma câmera acoplada a um microscópio fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; WABERSKI, 2014; MATOS *et al.* 2008). O CASA oferece confiabilidade e velocidade na obtenção dos dados, calculando as trajetórias e características de movimento dos espermatozoides (FIGUEROA, VALDEBENITO; FARIAS, 2016, MATOS *et al.* 2008).

Dentro das vantagens desse sistema está a quantificação de um grande volume de células com padrão heterogêneo em um pequeno espaço de tempo, motilidade e velocidade, detectando pequenas mudanças nos parâmetros sob várias condições experimentais (KRAEMER *et al.* 1998). Entretanto, para estes métodos serem eficientes são necessários conhecimentos básicos sobre configurações e os parâmetros utilizados nas análises (taxa de frames, tempo de vídeo e instante da avaliação) e padronização especial para cada espécie de peixe, com a utilização do software livre ImageJ/plugin CASA e VirtualDub.1.10.4 (SANCHES *et al.* 2010a; SANCHES, 2012).

Os softwares indicam a quantidade de espermatozoides que apresentam movimentos progressivos, ou não progressivos, velocidade espermática, linearidade, retilinearidade, oscilação, progressão, frequência de batimentos e número de espermatozoides (RAVINDER *et al.* 1997; RURANGWA *et al.* 2001; WILSON-LEEDY; INGERMANN 2007; SANCHES, 2011b).

Em relação aos procedimentos analíticos específicos, a motilidade, a velocidade curvilínea, a velocidade média de deslocamento e a velocidade em linha são os principais parâmetros do CASA usados para descrever os movimentos espermáticos. O uso desta ferramenta vem aumentando ao longo dos anos, sendo uma alternativa confiável e versátil (NEUMANN *et al.* 2017; SANCHES, 2011b).

3 REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology** v.81, p.5-17, 2014.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E.C. **Biologia e Fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. FUNEP; UNESP, p.336, 2014.
- BATISTA, M.; ALAMO, D.; GONZALEZ, F.; CRUZ, M. G.; GRACIA, A. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultra freezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. **Reprod Domest Anim**, v.41, n.5, p.423-428, 2006.
- BARBOSA, L.; SILVA, T. G.; SOUZA, F. A. O.; BARBOSA, P. T. L.; PRATES, M. F. M.; XAVIER, T. M.; CAETANO, R. A.; POVH, J. A. conservação e criopreservação de sêmen de peixes. Anais da x mostra científica FAMEZ / UFMS, Campo Grande, 2017.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 535-548, 2010.
- BORGES, A. M. **Criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 101p. Tese de doutorado.
- BORGES, A. M. *et al.* Ultraestrutura e criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em cativeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 72, n. 1, p. 253-262, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10709>.
- CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica** v.4 p.11-16. 2006.
- CAROLSFELD, D. J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: Worl Fishe Trust. Curso de treinamento brasileiro. V.47,1999.
- COELHO, G. C. Z.; DA SILVA COSTA, R.; BASHIYO-SILVA, C.; *et al.* Caracterização da ontogenia inicial de *Leiarius marmoratus* (GILL, 1870): larvas a juvenis. **J Appl Ichthyo**. 2019, v. 35, p.719 - 727. <https://doi.org/10.1111/jai.13830>
- COSSON, J. *et al.* **Ionic factors regulating the motility of fish sperm. The male gamete: from basic science to clinical applications**, p. 161-186, 1999.
- COSSON, J. Flagella parameters used as descriptors of fish spermatozoa motility. **Animal Reproduction. Science**, v. 169, p. 128-129, 2016.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; *et al.* Utilização de hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma spp*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, p. 168–173, 2006.

DALMMAS, F. H.; CARRARI, I. F.; CESCO, I. S.; *et al.* Guia de Indução Hormonal de Peixes Reofílicos. **INSTITUTO GIA**. Curitiba: [s.n.], 2016.

DZYUBA, B.; BONDARENKO, O.; FEDOROV, P.; GAZO, I.; PROKOPCHUK, G.; COSSON, J. Energetics of fish spermatozoa: the proven and the possible. **Aquaculture**, v. 472, p. 60-72, 2017.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Manual de curadores de germoplasma – Animal: conservação ex sito/in vitro de semen de peixe./ Paulo César Falanghe (*et al.*) . – Brasília, DF: Embrapa recursos geneticos e biotecnologia, 2012. 16 p - (Documento/ Embrapa recuros Genéticos e Biotecnologia, 339; Documento/Embrapa tabuleiros costeiros, 175).

FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura). 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9231en>

FORTES - SILVA, R.; COSTA, L. S.; PAULINO, R. R.; RODRIGUES, E. J. D.; SANCHEZ - VAZQUEZ, F. J.; ROSA, P. V. Modelo híbrido de peixe (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *Leiarius marmoratus*♂) para estudar o comportamento alimentar: proteína fonte de auto-seleção e ritmos de alimentação por demanda. **Aquac Res**, (2017), 48: 3705-3718. <https://doi.org/10.1111/are.13196>

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J. G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquaculture Research** v.47, p.1691-1705. 2016.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Motilidade espermática em peixes: aplicações técnicas e perspectivas através dos sistemas CASA-Mot. *Reproduction, Fertility and Development* v.30, p.820-832, 2018.

GALO, J. M.; *et al.* Qualidade espermática do Jundiá Amazônico *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) após o resfriamento. **Braz. J. Biol.** [online]. vol.74, n.4, p.933-938, 2014. ISSN 1519-6984. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.00313>.

GHELLER, S. M. M.; CORCINI, C. D.; BRITO, C. R.C.; ACOSTA, I. B.; TAVARES, G. C.; SOARES, S. L.; SILVA, A. C.; PIRES, D. M.; VARELA JUNIOR, A. S. Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiarius marmoratus*, **Cryobiology**, V. 87, p. 74-77, 2019. ISSN 0011-2240, <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.001>.

IHERING, R.; VON & AZEVEDO, P. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. **Arch. do Inst. Biológico**, v.7, p.107-120, 1936.

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

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. Sperm morphology and ultrastructure. In: ALAVI, S. M. H.; COSSON, J.; COWARD, K.; RAFIEE, G. (Eds.). **Fish Spermatology**. Oxford: Alpha Science International, p. 1-61, 2008.

LANZARIN, M.; RITTER, D. O.; NOVAES, S. F.; MONTEIRO, M. L. G.; ALMEIDA FILHO, E. S.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; CONTE, J. R.; FREITAS, C. A. M. Q. Quality Index Method (QIM) for ice stored gutted Amazonian Pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *Leiarius marmoratus*) and estimation of shelf life, **LWT - Food Science and Technology**. V. 65, p. 363-370, January 2016.

LASSO, C. A.; GUTIÉRREZ, F.P.; MORALES-BETANCOURT. M.A.; *et al.* I. Catálogo de los recursos pesqueros continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. **Instituto de Investigación de Recursos Biológicos**. [s.l.: s.n.], 2011.

LEMO, C. H. P.; CHUNG, S. R. CLÁUDIO, V. M.; COPATTI, C. E. *Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *Leiarius marmoratus*, Crescimento e variáveis bioquímicas em bagres da Amazônia (♂) sob diferentes pH de água. A. Acad. Bras. Ciênc. [conectados], vol.90, n.4 [citado em 2021-01-19], p.3573-3581, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820180241> .

LIMA, A. F.; RODRIGUES, A. P. O.; ALVES, A. L.; *et al.* Piscicultura de água doce multiplicando conhecimentos. **Embrapa**. Brasília, DF: [s.n.], 2013.

MARQUES, S. 2001. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce**. 98f. Dissertação (mestrado de Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Belo Horizonte.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; *et al.* Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225–232, 2009.

MELO, R. M. C.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; DOS SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei:Siluriformes). *Journal of Morphology*, v. 272, n.5, p. 525-535, 2011.

MELO, R. M. C.; GOMES, D. D.; MOREIRA, D. P.; GOMES, M. R.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. **Journal of Morphology**, v.278, p. 170-181, 2017.

MIRA, T.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Morfología testicular del 331 Yaque *L. marmoratus* (Pisces:Siluridae) em estágio de madurez reproductiva. International 332 **Journal of Morphology**, v.28, p.421-426, 2010a.

MIRA-LOPEZ, T. M.; MEDINA, R. V. M.; CRUZ, C. P. E. Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. *Rev. Med. Vet. Zootec.*, v.15, p.2070-2077, 2010.

MORTIMER, S. T., HORST, G. V. D., MORTIMER, D. The future of computer-aided

sperm analysis. **Asian Journal of Andrology** v.17, p.545-553, 2015.

MOURA, F. R., LIMA, R. R. S.; CUNHA, A. P. S.; MARISCO, P. C.; AGUIAR, D. H.; SUGUI, M. M.; SINHORIN, A. P.; SINHORIN, V. D. G. Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.56, p.241-248, 2017. ISSN 1382-6689, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019>.

NAVARRO, R. D.; PIVATO, I. Semen Characteristics of the Amazonian Jundiá (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870). **Bioscience Journal**, v. 32, p. 1552–1558, 2016.

NEUMANN, G.; *et al.* Contribuição do sistema CASA, baseado em software livre, para a avaliação das características espermáticas: abordagens informatizadas e baseadas no uso. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 46, n. 7, p. 560-568, julho de 2017.

OLIVEIRA-ALMEIDA, I. R.; BUZOLLO, H.; SILVA, C. R., *et al.*, Structural analysis of embryogenesis of *Leiarius marmoratus* (Siluriformes: Pimelodidae), **Zygote**, p. 1-16, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199414000392>

OLIVEIRA, D. **Fase embrionário e larval do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e do parental *Leiarius marmoratus***. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015 920 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

PANDOLFI, V. C. F.; YAMACHITA, A. L.; SOUZA, F. P.; LIMA, E. C. S.; AYRES, D. R.; BIGNARDI, A. B.; POVH, J. A.; PEREIRA, U. P.; URREA-ROJAS A, M.; LOPERA-BARRERO, N. M. Transferability of heterologous microsatellite primers in *Leiarius marmoratus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 41, n. 5, suplemento 1, p. 2297-2306, 2020

PEIXE BR. Anuário estatístico Peixe BR da Piscicultura 2020. Associação Brasileira de Piscicultura, p. 136, São Paulo; 2020.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoologischer Anzeiger**, v. 247, p. 55-66, 2008.

RAMÍREZ-GIL, H.; AJIACO-MARTÍNEZ, R. E. Aspectos preliminares de la biología 355 pesquera del yaque, *Leiarius marmoratus* (Gill,1870) (Pisces: Siluriformes: Pimelodidae) en 356 la parte alta Del río Meta Orinoquia Colombiana. Boletim Científico INPA, p.75-87, 1997.

RAVINDER, K., NASARUDDIN, K.; MAJUMDAR, K. C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology** v.50, p.1309-1328, 1997.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre: Edipucrs, p. 729, 2003.

RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. Criopreservação de Sêmen de Peixe. Corumbá – Circular técnica.84, MS. **EMBRAPA**. 2009.

RIZZO, E. & N. BAZZOLI. Reprodução e Embriogênese. Pp.265-284. In: Baldisserotto, B., J. E. P. Cyrino & E. C. Urbinati (Eds.). *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Jaboticabal, FUNEP, 336p, 2014.

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

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

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

SANCHES, E. **A metodologias de avaliação de sêmen e procedimentos de fertilização artificial de surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae***. 2012. Tese. Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP. Jaboticabal, São Paulo.

SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A. D.; BAGGIO, M.; SOUZA, B. E. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira De Zootecnia- Brazilian Journal of Animal Science* v.38, p.2091-2098, 2009.

SANCHES, E. A., OKAWARA, R. Y.; CANEPPELE, D.; BOMBARDELLI, R. A.; ROMAGOSA, E. 2011d. Sperm motility parameters of *Steindachneridion parahybae* studied by means of casa open source software. Page 1002 in WAS, editor. The Annual International Conference of World **Aquaculture Society**, Natal.

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

SANTOS, R. R.; XAVIER, R. G. C.; OLIVEIRA, T. F.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Occurrence, genetic diversity, and control of *Salmonella enterica* in native Brazilian farmed fish. **Aquaculture**, v. 501, p. 304-312, 2019 (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.034>).

TAVARES, G. C.; QUEIROZ, G. A.; ASSIS, G. B. N.; LEIBOWITZ, M. P.; TEIXEIRA, J. P.; PEREIRA FIGUEIREDO, H. C.; LEAL, C. A. G. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leiarius marmoratus x Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. **Aquacultures**. V. 495, October 2018, p.384-392. ISSN 0044-8486,

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.027>.

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

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), In: BALDISSEROTTO, B., CARVALHO GOMES, L. (Eds.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. UFMS, Santa Maria, 2013, p. 225–246.

VIVEIROS, A. T. M.; ISAU, Z. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEITE, M. A. S.; MARIA, A. N. Gentamycin Controls Bacterial Growth during Refrigerated Storage of Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Semen. Journal of the World **Aquaculture Society** v.41, p.57-65, 2010.

WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology** v.67, 661-672. 2007.

WINTERS, A. D.; LANGOHR, I. M.; SOUZA, M. D. E. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, M. P.; FAISAL, M. (2016) Ultrastructure and molecular phylogeny of Pleistophora hyphessobryconis (Microsporidia) infecting hybrid jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) in a Brazilian aquaculture facility. **Parasitology**, v.143, p. 41–49, 2016.

YABU, M. H. S.; VIDOTTO-MAGNONI, A. P.; CASIMIRO, A. C. R.; GARCIA, D. A. Z.; COSTA, A. D. A.; PRADO, F. D. D.; ORSI, M. L. *et al.* (2018) Primeiro registro de bagre híbrido não nativo *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus* na bacia do Alto Rio Paraná, Brasil. **Journal Fish Biology** v.92, p.261–267, 2018. <https://doi-org.ez78.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jfb.13505>

4 HIPÓTESE

A temperatura do armazenamento promove alterações na qualidade espermática no decorrer do tempo de exposição no semê do *Leirarius marmoratus*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a qualidade espermática computadorizada do *L. marmoratus* no armazenamento refrigerado e na temperatura ambiente em quatro tempos no decorrer de 28 horas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o armazenamento refrigerado sobre a qualidade espermática do *Leiarius marmoratus* no decorrer de 28 horas avaliado em quatro tempos diferentes.
- Avaliar o armazenamento em temperatura ambiente sobre a qualidade espermática do *Leiarius marmoratus* no decorrer de 28 horas avaliado em quatro tempos diferentes.
- Avaliar quatro tempos sobre a qualidade espermática do *Leiarius marmoratus* no decorrer de 28 horas.
- Avaliar a qualidade espermática computadorizada do *Leiarius marmoratus*.
- Configurar caixa diálogo do plugin CASA/ImageJ para avaliação dos parâmetros espermáticos em *Leiarius marmoratus*.

6 ARTIGO – QUALIDADE ESPERMÁTICA DO JUNDIÁ AMAZÔNICO (*LEIARIUS MARMORATUS* GILL, 1870) SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPOS E TEMPERATURAS.

SPERMATIC QUALITY OF THE AMAZON JUNDIÁ (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870) SUBJECT TO DIFFERENT TIMES AND TEMPERATURES.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tempos e temperaturas (refrigerado e o em temperatura ambiente) sobre a qualidade espermática no sêmen do *Leiarius marmoratus* in natura. O sêmen proveniente de cinco reprodutores foi distribuído em um delineamento experimental em esquema fatorial (2x4). Os fatores foram constituídos pelo tipo de armazenamento, ambiente e resfriado, e os tempos de exposição: 0 (controle), 12, 20 e 28 horas pós-coleta. Foi utilizando sistema computadorizado de código aberto – CASA. Avaliaram-se os seguintes parâmetros espermáticos do sêmen: Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VMD), velocidade em linha reta (VLR), retilinearidade (RET), oscilação (OSC), progressão (PROG), frequência de batimento cruzado (FBC), taxa de espermatozoides normais (NOR) e taxa de sobrevivência (SOB). Os parâmetros VCL, VMD e VLR foram agrupados para formação da velocidade espermática (VE) através da análise de componentes principais. A MOT, RET, NOR e SOB tiveram efeito do tipo de armazenamento e do tempo ($P < 0,05$). A FBC teve efeito do tempo ($P < 0,05$). A melhor qualidade espermática foi observada no sêmen fresco, porém, apesar de estar armazenado por 28 horas o refrigerado apresentou motilidade satisfatória de 58,58%. Por outro lado, no armazenamento em temperatura ambiente foi observada uma boa qualidade espermática até as primeiras 12 horas de armazenamento, com motilidade satisfatória de 64,20%. Sugere-se, caso haja a necessidade de estocagem de sêmen por curto-período, que seja realizado em um ambiente refrigerado ou em temperatura ambiente por no máximo 12 horas.

Palavras-chave: Análise espermática computadorizada. Reprodução. Peixe Nativo. Siluriforme. Qualidade espermática.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different storage times and temperatures (refrigerated and at room temperature) on sperm quality in the semen of *Leiarius marmoratus* in natura. Semen from five breeders was distributed in a factorial design (2 × 4). The factors were categorized by the type of storage, environment and cold, and exposure time (0 (control), 12, 20, and 28 h after collection). An open-source computerized system (CASA) was used for analysis. The following spermiatic parameters of semen were evaluated: motility rate (MOT), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), straightness (STR), wobble (WOB), progression (PROG), cross-beat frequency (BFC), normal sperm rate (NOR), and survival rate (SOB). The VCL, VAP, and VSL were grouped into the sperm velocity (VS) by analyzing the main components. The MOT, STR, NOR, and SOB were influenced by the storage type and time ($P < 0.05$), whereas the BFC was only affected by the time ($P < 0.05$). Fresh semen exhibited the best sperm quality; however, despite being stored for 28 h, refrigerated semen had a satisfactory motility of 58.58%. On the other hand, when stored at room temperature, the sperm quality was good only up to the first 12 h of storage, with a satisfactory motility of 64.20%. These results suggest that when semen is to be stored for a short period, it should be placed either in a refrigerated environment or at room temperature for a maximum of 12 h.

Keywords: Computerized sperm analysis. Reproduction. Native fish. Siluriform. Sperm quality.

1. Introduction

Leiarius marmoratus (Siluriformes: Pimelodidae; GILL, 1870) is a catfish native to the Amazon, Orinoco, and Essequibo River basins [1]. It is of great importance for Brazilian fish farming, mainly for its commercial exploitation in interspecific crossing with other catfish (*Pseudoplatystoma* sp.) [2]. Its rheophilic behavior makes it more vulnerable during reproduction in captivity, which causes reproductive dysfunctions, with the production of a small amount of semen [3, 4]. Therefore, exogenous stimulation using hormonal inducers is needed [5, 6].

Sperm quality is an essential characteristic of a good reproductive process [7]. Based on the hypothesis that sperm lose quality over time after collection, storage methods are applied to guarantee longevity, optimize the use of reproducers, and increase the efficiency of the procedures used in artificial propagation [8].

The short-term seminal cooling technique for fish semen conservation is a very old practice that promotes the conservation of seminal characteristics for hours or even days, and allows the use of semen at the most appropriate time of reproduction. It is less expensive than freezing techniques and does not require the use of cryoprotectants, thus enabling cooling at low temperatures [9].

The objective of this study was to evaluate the effect of different storage times and temperatures (refrigerated and at room temperature) on the sperm quality of the semen of *L. marmoratus* in natura.

2. Materials and Methods

2.1. Location of study and animals

The study took place at the Fish Culture Experimental Station of the Federal University of Mato Grosso do Sul, located in the University City in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) (20° 29' 59" S and 54° 36' 53" W), and in a commercial fish farm located in the municipality of Terenos (MS) (20° 26' 18" S and 54° 51' 24" W), Midwest of Brazil, during the beginning of the breeding season (October 2019).

During the phase that preceded the collection of the biological material used in the experiment, the animals used were kept in two different excavated ponds, measuring approximately 1200 m², with a depth of 1.5 m. They were fed once a day in the afternoon based on biomass, with extruded feed having the following composition for carnivorous fish: moisture (12%), crude protein (40%), ethereal extract (8%), fibrous matter (3%), mineral matter (13%), calcium (2.2%), phosphorus (1%), digestible energy 3400 kcal/kg, vitamin A 16000 UI/kg, vitamin C 350 mg/kg, vitamin D3 4000 UI/kg, vitamin E 128 UI/kg, vitamin K3 8 mg/kg, vitamin B1 16 mg/kg, vitamin B2 20 mg/kg, vitamin B6 13.5 mg/kg, vitamin B12 105 mcg/kg, folic acid 7 mg/kg, pantothenic acid 80 mg/kg, biotin 0.7 mg/kg, choline 1800 mg/kg, niacin 130 mg/kg, copper 6 mg/kg, iron 50 mg/kg, iodine 1.3 mg/kg, manganese 15 mg/kg, selenium 0.3 mg/kg, zinc 100 mg/kg, and inositol 100 mg/kg.

Ten broodstocks of *L. marmoratus* that were in the gonadal maturation stage, identified by a soft abdomen and semen release after light pressure in the craniocaudal direction, were selected. The selected animals were kept in aquariums with constant aeration within the fish culture laboratory, weighed, and identified through transponders located in the dorsal muscular region of each fish.

2.2. Hormonal induction

Seven males were induced with a single dose of carp pituitary extract (EHC) of 2.5 mg EHC/kg body weight; the un-induced males formed the control group. Semen collection was carried out after 180 h through a specific abdominal massage in the craniocaudal direction. The breeders were wrapped individually with clean, moist towels, and the urogenital papillae were cleaned and dried before collection to avoid contamination (stool, urine, and water). Owing to the location of the testicle, extraction presented great difficulty, with low volumes of semen release.

Of the ten males, only five released semen; one was from the control group. The semen was collected with sterile 5 mL syringes and transferred to a 1.5 mL microtube with 5% Beltsville Thawing Solution (BTS) at a 1:1 ratio. The volume released and sperm concentration were measured.

2.3. Sperm analysis

Semen from the five males was distributed in a completely randomized design in a factorial scheme (2 × 4). The factors were categorized by the type of storage, environment (29.38 ± 2.99 °C) and cold (16.11 ± 2.20 °C), and exposure time (0 (control), 12, 20, and 28 h after collection). Since *L. marmoratus* generally lives in an area with a tropical climate, the choice of cold storage temperature was based on the natural temperature that these animals live in, with an average of 25 °C [10].

The semen of each male was considered a replica, and the sperm parameters were evaluated in triplicate. After starting the procedure for storing the semen of a single male, the seminal collection of the next male was carried out, sequentially interspersing the times of analysis. For semen exposure, 1.5 mL microtubes containing 0.1 mL of diluted semen were used for each temperature and time period, constituting an experimental unit.

For the cooled environment, a refrigerator containing a thermostat for temperature control was used. The ambient temperature was considered the temperature of the medium (29.38 ± 2.99 °C) in which the samples were stored and read; a mercury thermometer was inserted in the medium for constant temperature measurement.

The seminal volume released was measured using a 100 μ L precision pipette. To measure the sperm concentration, one sample was used for each male; 1 μ L of semen was diluted in 2,000 μ L of buffered saline [11]. A Neubauer hematimetric chamber was used for sperm cell count.

Sperm survival rate (TSOB) was evaluated using the eosin-nigrosin staining method adapted from Blom [12], with 30 μ L of semen, 90 μ L of yellow eosin (3%), and 90 μ L of nigrosin (5%). After processing the slides, 200 sperms per slide [13] were analyzed under a photomicroscope (magnification $\times 400$) [14], with colorless sperm considered alive and stained sperm dead [15].

To evaluate the possible morphological alterations of spermatozoa (MORF), the methodology employed by Streit Jr. et al. and Bombardelli et al. [16, 17] was used for making slides. Then, 500 μ L of sperm + buffered saline formalin (1:1,000 semen: fixer dilution) was transferred to a microtube (1.5 mL), and 10 μ L of rose bengal dye was added. After homogenization, 10 μ L of fixative + sperm + dye was added to one end of the glass slide. The slide was tilted at a 45° angle to slide the droplet to the other end. The slides were then dried in open air and analyzed under a photomicroscope (magnification $\times 400$) [18]; 200 sperm were evaluated [13] and classified as normal or abnormal.

Sperm motility parameters were evaluated using the computer-assisted sperm analysis (CASA) method. To this end, the methodology adopted by Wilson-Leedy & Ingermann [19] was used for analysis using open-source software. For sperm activation, distilled water at room temperature (29.38 ± 2.99 °C) was used. For the activation process, 10 μ L of semen and 500 μ L of water (1:50) were used in microtubes (1.5 mL). After activation, 10 μ L of semen and water were added to a mirrored Neubauer chamber (100 μ m depth), covered with a glass coverslip (24 \times 24 mm), and placed under a previously focused (obj. 40 \times) Nikon trinocular light microscope (model e200) to capture images. A Basler 602fc camera (Basler Vision Technologies) coupled to a computer (Intel Core i7© CPU 2.3 GHz, 4 GB of RAM, Microsoft Windows XP© (Microsoft Corporation) operating system) was used.

Captures and video editing of sperm parameters were performed according to the methodology described by Sanches et al. [11] with settings adapted for *L. marmoratus*. The videos were captured using AMCAP software (<http://noeld.com>), at a rate of 100 frames per second (656 × 490 pixels), and processed using VirtualDub software (<http://virtualdub.org>). The videos were edited, converted into an image sequence, with 100 images corresponding to each second of video, and saved in a specific directory. After this procedure, the images were analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) with the CASA application (University of California and Howard Hughes Medical Institute, <HTTP://://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/casa.html>). The settings used in the CASA plugin dialog (Table 1) were efficient in defining mobile and static spermatozoa for the species. All analyses were performed 10 s after sperm activation.

The sperm parameters calculated using the free CASA plugin were: motility rate (MOT), straightness (STR), curvilinear velocity (VCL - velocity between each evaluated frame), average displacement velocity (VAP - velocity between each frame using the average displacement at the rate of 1/6 of the frame rate used), straight line speed (VSL - speed between the first and last frame analyzed), wobble (WOB - obtained by dividing VAP by VCL), cross-beat frequency (FBC), and progression (PROG - obtained by dividing VSL by VAP).

Table 1 - Settings used in CASA/ImageJ plugin dialog box to evaluate sperm parameters for *Leiariius marmoratus* with video recorded on a 40x objective at 100 fps (656 × 490 pixels). Settings for evaluating 10 s of video or 1000 frames.

| Input parameters | Input values |
|--|---------------------|
| A. Minimum sperm size (pixels): | 1 |
| B. Maximum sperm size (pixels): | 45 |
| C. Minimum track length (frame): | 100 |
| D. Maximum sperm velocity between frames (pixels): | 80 |
| E. Minimum VSL for motile ($\mu\text{m/s}$): | 1 |
| F. Minimum VAP for motile ($\mu\text{m/s}$): | 3 |
| G. Minimum VCL for motile ($\mu\text{m/s}$): | 12 |
| H. Low VAP speed ($\mu\text{m/s}$): | 50 |
| I. Maximum percentage of path with zero VAP: | 1.0 |
| J. Maximum percentage of path with low VAP: | 3 |
| K. Low VAP speed 2 ($\mu\text{m/s}$): | 12 |
| L. Low VCL speed ($\mu\text{m/s}$): | 35 |
| M. High WOB (percent VAP/VCL): | 80 |
| N. High LIN (percent VSL/VAP): | 80 |

| | |
|--|--------|
| O. High WOB two (percent (VAP/VCL): | 80 |
| P. High LIN two (percent VSL/VAP): | 60 |
| Q. Frame rate (frames per second): | 100 |
| R. Microns per 1000 pixels: | 561.79 |
| S. Print xy co-ordinates for all tracked sperm?: | 0 |
| T. Print motion characteristics for all motile sperm?: | 0 |
| U. Print median values for motion characteristics?: | 0 |

Fonte: Próprio autor

Outline values were identified and excluded from the analysis. The VCL, VAP, and VSL results were subjected to principal component analysis (PCA) using Statistica© software (StatSoft 2005) and grouped to form a new variable called sperm velocity (VS) ($VS = a \times VCL + b \times VAP + c \times VSL$), in accordance with the method of Adames, Tessaro et al. and Sanches et al. [20, 21,8], where a, b, and c represent the contributions of the correlations of the variables VCL, VAP, and VSL, respectively.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the statistical software R (R Core Team, 2017), with a significance level of 5%. Analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's test. Analyses that did not meet the assumptions of residual normality or homogeneity of variance were re-performed as non-parametric multiple comparison analyses using Dunn's test. A correlation test between treatments and one between the VS x MOT variables were performed.

3. Results

3.1. Seminal data immediately after collection

The seminal collection data are presented in Table 2. The sperm parameters observed immediately after collection are described in Appendix A. The seminal volume released was low, as expected for the species, with a maximum volume of 1 mL. The sire that did not receive hormonal induction released the lowest volume but presented the highest sperm concentration.

Table 2 - Data on sires used for collection, seminal volume released, and sperm concentration.

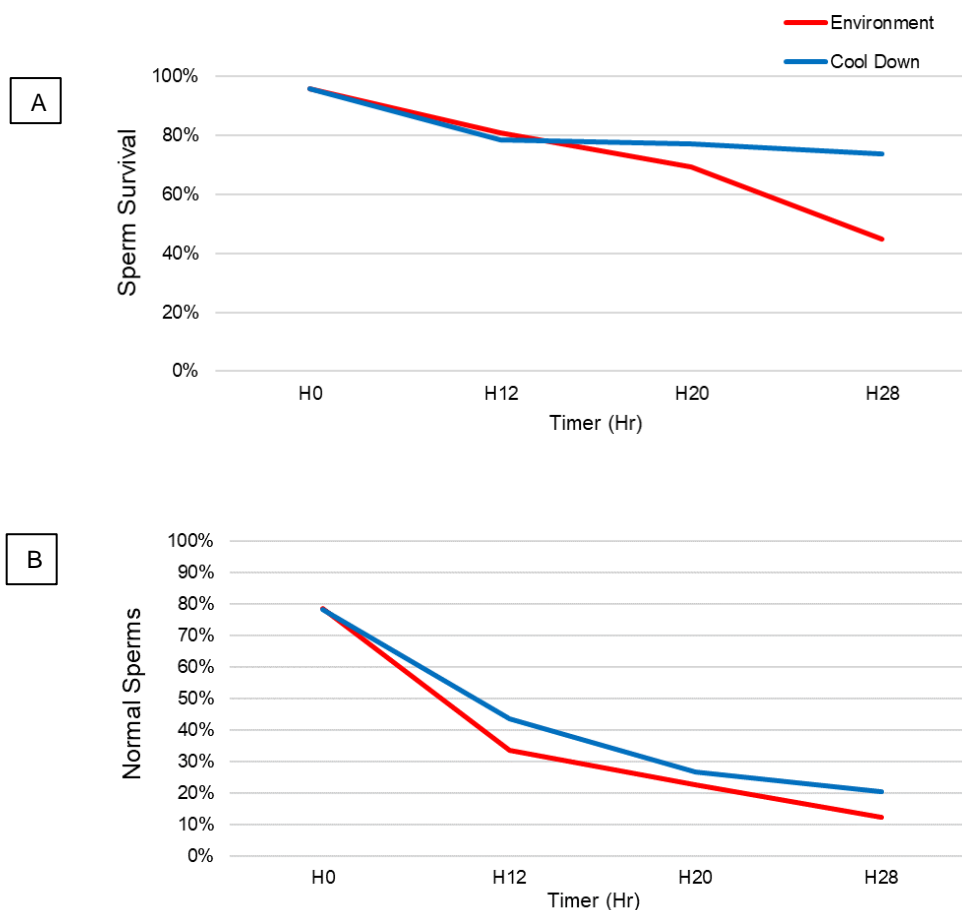
| Breeder | Weight (Kg) | Induction | Vol. seminal (mL) | Concentration |
|---------|-------------|-----------|-------------------|---------------------------|
| 1 | 3.4 | Yes | 1.00 | 1.7 X 10 ⁹ /mL |
| 2 | 3.9 | Yes | 0.82 | 1.9 X 10 ⁹ /mL |
| 3 | 3.4 | Yes | 0.70 | 1.7 X 10 ⁹ /mL |
| 4 | 2.6 | Yes | 0.60 | 1.9 X 10 ⁹ /mL |
| 5 | 3.3 | No | 0.33 | 2.0 X 10 ⁹ /mL |

Fonte: Próprio autor

3.2. Assessment of TSOB and MORF

The sperm survival rate (Graphic 1) showed an interactive effect of time and storage, linear decreasing behavior, and higher values in the refrigerated environment and after collection, similar to that observed for the normal sperm rate. The survival rate in the first 12 h was similar for both storage types. Semen stored in the environment showed poorer rates of survival and sperm normality.

Graphic 1. Survival sperm rate (A) and normal semen rate (B) of *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.



Fonte: Próprio autor

3.3. Sperm parameters generated in CASA

The seminal parameters observed in CASA are presented in Table 3. The MOT was affected by the type of storage and time (Graphic 2), and decreased over time; it was better under refrigerated storage, at 58.58% after

28 h of storage. Motility was viable up to the first 12 h of storage in the environment, with a decreasing linear effect over time.

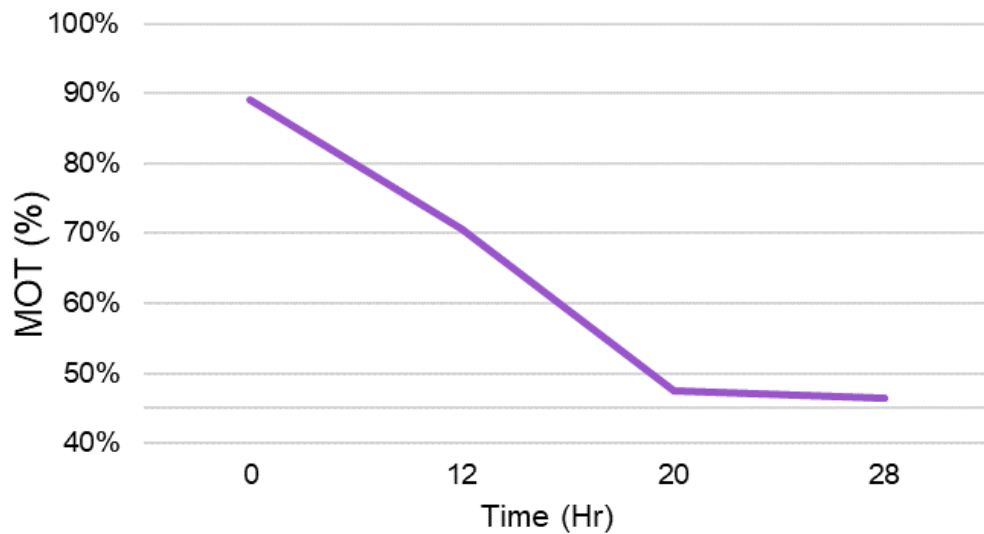
Table 3 - Seminal parameters observed in CASA for *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.

| | Times | | | | | | | | P value |
|------------------|--------|----|--------|-----|--------|-----|--------|----|---------|
| | 0 | | 12 | | 20 | | 28 | | |
| MOT (%) | | | | | | | | | |
| Environment | 89.09 | Aa | 64.2 | Bab | 35.25 | Bb | 34.36 | Bb | 0.01 |
| Cool Down | 89.09 | Aa | 76.87 | Aab | 59.62 | Ab | 58.58 | Ab | 0.001 |
| Envi*Time | - | | - | | - | | - | | 0.103 |
| STR (%) | | | | | | | | | |
| Environment | 95.46 | Aa | 94.91 | Aa | 97.11 | Aa | 97.37 | Aa | 0.001 |
| Cool Down | 95.46 | Aa | 94.29 | Aa | 95.88 | Aa | 94.83 | Aa | 0.048 |
| Envi*Time | - | | - | | - | | - | | 0.028 |
| WOB (%) | | | | | | | | | |
| Environment | 71.78 | Aa | 72.54 | Aa | 70.51 | Aa | 77.05 | Aa | 0.162 |
| Cool Down | 71.78 | Aa | 71.83 | Aa | 70.23 | Aab | 67.11 | Ab | 0.902 |
| Envi*Time | - | | - | | - | | - | | 0.066 |
| PROG (µm) | | | | | | | | | |
| Environment | 1698.3 | Aa | 1576.9 | Aa | 1671.5 | Aa | 1876.3 | Aa | 0.571 |
| Cool Down | 1698.3 | Aa | 1592.8 | Aab | 1800.9 | Aa | 1505.5 | Ab | 0.771 |
| Envi*Time | - | | - | | - | | - | | 0.265 |
| FBC (Hz) | | | | | | | | | |
| Environment | 47.9 | Aa | 50.9 | Aa | 53.25 | Aa | 53.26 | Aa | 0.355 |
| Cool Down | 47.9 | Aa | 50.82 | Aa | 49.57 | Aa | 51.29 | Aa | 0.054 |
| Envi*Time | - | | - | | - | | - | | 0.492 |

Different lowercase letters in the lines indicate statistical difference by the Tukey test ($P < 0.05$); same letters do not differ significantly from each other. Different capital letters in the columns indicate statistical difference by the Tukey test ($P < 0.05$); same letters do not differ significantly from each other.

Fonte: Próprio autor

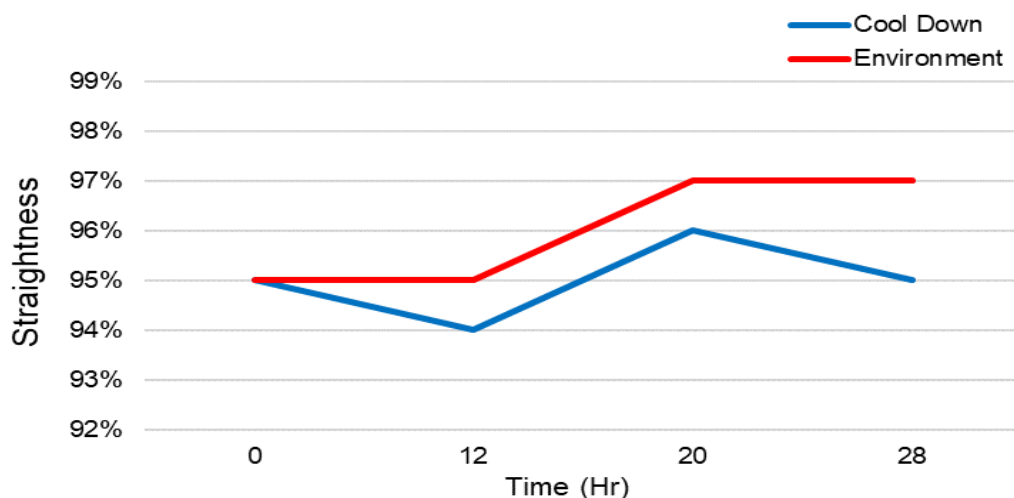
Graphic 2. Effect of four time periods on mean motility rate for two types of storage of semen of *Leiarius marmoratus*.



Fonte: Próprio autor

The observed STR of the spermatozoa path was similar in the different treatments, and there was a relationship between the type of storage and evaluation time. Under ambient storage, the effect was a linear increase as a function of the evaluation time; however, under cold storage, there was a cubic effect as a function of the evaluation time (Graphic 3). Refrigerated sperm had a lower percentage of STR at all times.

Graphic 3. Effect of storage type and time on sperm straightness in *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.

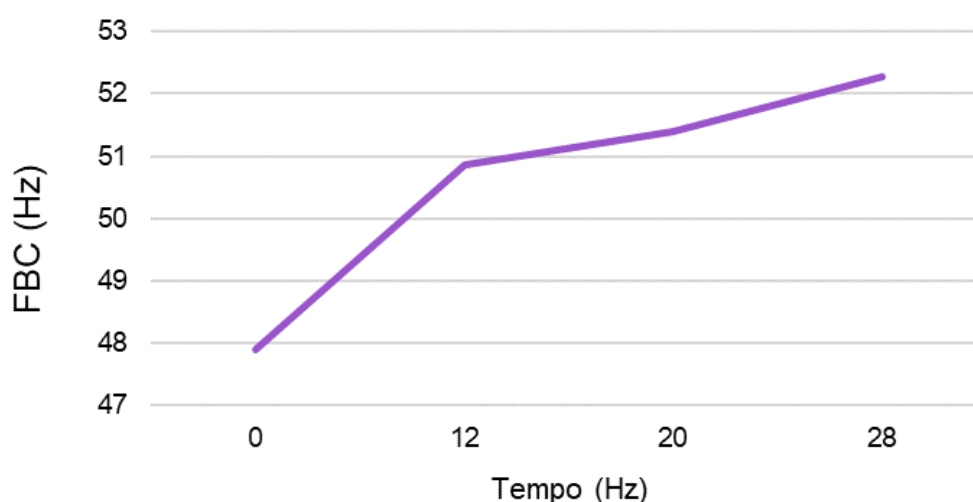


Fonte: Próprio autor

The WOB and PROG did not differ statistically, showing similar values in both environments over time. PROG decreased in the first 12 h of storage, and its progression oscillated during the other evaluation times.

The evaluation time influenced the BFC, showing an increasing linear effect (graphic 4), with a similar but higher value under ambient storage during the evaluation periods; however, this was not statistically different.

Graphic 4. Effect of time on cross-beat frequency in semen of *Leiarius marmoratus* subjected to two types of storage and evaluated in four stages.



Fonte: Próprio autor

3.5. Principal Component Analysis (PCA)

There was a linear correlation ($P < 0.05$) between sperm velocities VCL \times VAP, VCL \times VSL, and VAP \times VSL, with correlation coefficients (r) of 96.93%, 96.60%, and 99.83%, respectively. The grouping of these variables generated an equation that described the sperm velocity parameter: $VS = 0.328671 \times VCL + 0.336032 \times VAP + 0.335297 \times VSL$.

The VS values are presented in Table 4; the VS in the two types of storage over time was similar. Refrigerated storage was superior only at the time point of 20 h. The correlation between VS and MOT was not significant ($P < 0.05$).

Table 4 - Sperm velocity of *Leiarius marmoratus* after exposure of in natura semen to two storage environments for different time periods.

| Storage | Time |
|---------|------|
|---------|------|

| | 0 | 12 | 20 | 28 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|
| Environment | 48.51 A | 47.14 A | 47.14 A | 51.57 A |
| Cool Down | 48.51 A | 44.95 B | 51.36 B | 43.79 B |

Different letters in the columns indicate statistical difference by the Tukey test ($P < 0.05$); same letters do not differ significantly from each other.

Fonte: Próprio autor

4. Discussion

The relative seminal volume observed in fresh semen after hormonal induction of 0.69 ± 0.25 mL was close to that found by Borges et al. (0.66 ± 0.28 mL) [22]. This value is lower than those observed by Gheller et al. (4.1 mL) [23], Riveros-Pinilla et al. (3 mL) [24], and Araújo et al. (1.53 mL) [25].

Owing to the location of the testicle and the accumulation of fat, semen extraction by manual extrusion is very difficult, resulting in low-volume extraction. Other external factors, such as the late rainy season and induction at the beginning of the reproductive season may have influenced this result. It is known that the stage of the reproductive season can influence the sperm quality [25, 26]. These variations are common in South American native fish, which may be influenced by season, genetics, induction protocol, collection methodology [27], and environmental conditions during sperm activation [28].

The highest survival rates of treated sperm and normal sperm were observed during refrigerated storage, and this was possibly related to reduced metabolism of sperm cells at low temperatures, and low degradation [29, 30]. Sanches [11] observed a similar behavior with *Steindachneridion parahybae*. Morphological alterations in spermatozoa can directly influence the fertility of the sire [31, 32]. For fish, there is no morphological index that can indicate the extent to which the bloodstocks are viable [8].

The sperm motility and observed sperm concentration of 89.09% and 1.82×10^9 mL, respectively, were close to the values observed by Navarro and Pivato (83.3% and 1.79×10^9 mL) [2], and Borges et al. (84.22% and 2.51×10^9 mL) [22]. They were lower than the values observed by Gheller et al. (95.7% and $8.7 \pm 0.2 \times 10^9$) [23] and Galo et al. (87%) [7] for the same species. The proximity of the values found by different authors and those observed in this experiment indicates that the semen used presented satisfactory quality.

The MOT regressed, showing the effects of the type of storage and time. Cooled semen showed the highest percentage of motility during all the storage periods, indicating a better storage condition for the semen of this species, with 58.58% motility in 28 h. Galo *et al.* [7] observed a motility of 40% after 7 h for cooled semen (13 ± 2 °C) for the same species. Research on other native fish species also showed a reduction in MOT upon cooling for *Piaractus mesopotamicus* and *Prochilodus lineatus* (40% at 8 pm), *Leporinus friderici* and *Leporinus elongatus* (30% at 8 am) [33], and *Colossoma macropomum* (33.72% at 25 h) [34].

Semen stored at room temperature had a low MOT and high VS, STR, and FBC when compared with that under cold storage. Cosson [35] reported that some physical factors, such as temperature, can affect the duration and vigor of sperm motility. According to Mehlis and Bakker [36], high temperatures are detrimental to sperm performance, as they increase sperm velocity and straightness, and decrease the percentage of motile sperm, thus reducing sperm quality.

The STR under cold storage showed a cubic effect as a function of the evaluation time, reducing the metabolism of cells, making them slower, decreasing the VS, and making the path increasingly straight with the loss of circular movement. Despite this effect, the STR was lower in the refrigerated samples. Other authors observed a similar relationship between time and temperature for other species such as *S. parahybae* over 112 h of storage at four temperatures [11] and *C. macropomum* over 35 h at two temperatures [34]. They emphasized that a reduction in storage temperature as a function of time can promote better conditions for obtaining this type of sperm behavior.

The WOB is a parameter that indicates the efficiency of the spermatocidal forward movement, lower values of which represent greater oscillation [37]. Similar percentages were observed under both storages up to 20 h; the WOB under cold conditions was statistically lower, with less oscillation, consistent with motility [38].

Compared with that of cooled sperm, the PROG of sperm stored at room temperature decreased earlier in the first 12 h, indicating that this characteristic was maintained at satisfactory levels when the semen was cooled.

Cooling decreased the FBC, suggesting a worsening of this characteristic upon temperature reduction. Pires *et al.* [34] observed an opposite behavior in cooled semen of *C. macropomum*, wherein the frequency of beats increased in 15 h. The FBC at time zero was 47.9 Hz lower than that for the other storage times, and higher than that

reported in the literature immediately after collection for *C. macropomum*: 23.82 Hz [34], 20.0 Hz [39], and 34.0 Hz [40].

The VS is widely used to assess the effects of semen tracking on sperm cell viability and fertility [41]. The grouping of VCL, VAP, and VSL helped optimize the analysis and evaluation of the results. Similar grouping of these variables was successfully performed for three other South American catfish, *Rhamdia quelen* [20, 42], *S. parahybae* [8], and *Steindachneridion melanodermatum* [42].

The reduction in sperm quality at room temperature may be associated with increased metabolic rates of sperm cells when subjected to high temperatures [43]. The values of sperm velocity were initially high and then gradually reduced; high temperatures accelerated this process, resulting in a speed explosion in the first seconds of activation [29, 30]. The VS and FBC increased, and the MOT decreased, making the movement straight. Other factors that may be associated with this result are colonization by bacteria and the enzymatic activity of malate dehydrogenase and aspartate aminotransferase, which are directly related to sperm quality and whose activity is directly related to temperature [44], leaving the medium in an anoxic condition [43, 45, 46].

The viability of fish semen can be extended for several days; however, several factors such as breeder variability, multiple biological interactions, technical and physical factors, spermiation procedures, and storage conditions are crucial to maintaining viability [47].

The effects of enzymes, bacteria, metabolic rates, and biochemical parameters on sperm quality in several fish species have been clarified [8]; however, the effects of these parameters on sperm quality in *L. marmoratus* are unknown. Nevertheless, such studies provide new perspectives on the possible influences of these parameters on sperm quality in the Amazon silver catfish and can be tested in future studies of semen storage for this species.

5. Conclusion

In conclusion, the best sperm quality was observed immediately after collection. If there is a need for storage for a short period of time, it is recommended to carry out refrigerated storage (16.11 ± 2.20 °C), which showed good sperm viability over time, with 58.58% motility in 28 h of storage in this study. Sperm quality significantly reduced

over time during storage at room temperature (29.38 ± 2.99 °C), from a significant value up to the first 12 h of storage with 64.20% motility. If a refrigerated environment is not available to store the semen of *L. marmoratus*, it is advisable to store it at room temperature for a maximum of 12 h.

Acknowledgment

The authors would like to thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Postgraduate Program in Animal Science of State University of Londrina, professors and students who participated in this project, the private fish farm that provided us with the animals and space, State University of Londrina, Federal University of Mato Grosso Do Sul, and Paulista State University.

References

- [1] Lasso CA, Morales Betancourt, MA. Catalog of continental fishery resources of Colombia: technical and explanatory report, executive summary. Ministry of the Environment, Housing and Territorial Development; Humboldt Institute. 118 p. Series hydrobiological and continental fisheries resources of Colombia. 2011
- [2] Navarro RD, Pivato I. Semen characteristics of the amazonian jundiá (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870). Biosci J 2016; 32:1552-1558. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n6a2016-33749>
- [3] Crepaldi DV, Faria PMC, Teixeira EA, Ribeiro LP, Costa AAP, Melo DC, et al. Hormone utilization in the Spotted Brazilian catfish (*Pseudoplatystoma* spp) reproduction. Rev Bras Reprod Anim 2006; 30:168-173. [http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB140%20Crepaldi%20\(Biologia%20reprodutiva\)%20pag%20159-167.pdf](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB140%20Crepaldi%20(Biologia%20reprodutiva)%20pag%20159-167.pdf) (accessed July 21, 2021)
- [4] Mira-Lopez TM, Medina RVM, Cruz CPE. Evaluation of three protocols for hormonal induction of spermiation in yaque *Leiarius marmoratus*. Rev mvz Córdoba 2010; 15:2070-2077. <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v15n2/v15n2a05.pdf> (accessed July 21, 2021)
- [5] Dalmass FH, Carrari IF, Cesca E, Novak M. Guide to Hormonal Induction of Rheophilic Fish. Curitiba: Instituto GIA; 2016. Digitized publication.

- [6] Rizzo E, Bazzoli N. Reproduction and Embryogenesis. In: Baldisserotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. Biology and Physiology of Neotropical Freshwater Fish. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2014;13: 265-284
- [7] Galo JM, Streit JR DP, Povh JA, Fornari DC, Resende EK, Oliveira D, Ribeiro RP. Sperm quality of the Amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. *Jornal Brasileiro de Biologia*. 2014; 74:933-938. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.00313>
- [8] Sanches E, Okawara RY, Caneppele D, Toledo CPR, Bombardelli RA, Romagosa E. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112 h of storage at four temperatures. *J. Appl. Ichthyol.* 2015; 31: 79–88. doi: 10.1111/jai.12728
- [9] Pires LB, Silva TG, Souza FAO, Barbosa PTL, Prates MFM, Xavier TM, Correa Filho RA, Povh JA. Conservation and cryopreservation of fish semen. In: Mostra FAMEZ 2017 Campo Grande. Conservação e criopreservação de sêmen de peixes, 2017. <https://famez.ufms.br/files/2015/09/CONSERVA%C3%87%C3%83O-E-CRIOPRESERVA%C3%87%C3%83O-DE-S%C3%89MEN-DE-PEIXES.pdf> (accessed July 21, 2021)
- [10] Ramírez-merlano JA, Otero-paternina AM, Corredor-santamaría W, Medina-robles VM, Cruz-casallas PE, Velasco-santamaría YM. Utilization of living organisms as a first feeding of yaque (*Leiarius marmoratus*) larvae under laboratory conditions. *Orinoquia* [en línea]. 2010; 14:45-58. ISSN: 0121-3709. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89615714006> (accessed July 21, 2021)
- [11] Sanches EA, Baggio DM, Piana PA, Souza BE, Bombardelli RA. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *Brazilian Journal of Animal Science*. 2011; 40:1-6. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>
- [12] Blom EA. One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility*. 1950; 1:176-177
- [13] CBRA. Manual for andrological examinations and evaluation of animal semen. Brazilian College of Animal Reproduction, Belo Horizonte. 1998
- [14] Sanches EA, Bombardelli RA, Baggio DM, Souza BE. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Brazilian Journal of Animal Science*. 2009; 38:2091-2098. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001100003>

- [15] Kavamoto E, Fogli da Silveira W. Physical characteristics, and microscopic chemistry of catfish semen, *Rhamdia hilarii*. Boletim do Instituto de Pesca. 1986; 13:95-100. https://209.124.77.230/index.php/bip/article/view/sumario_13_95-100 (accessed July 11, 2021)
- [16] Streit JR DP, Ribeiro RP, Moraes GV, Mendezs LV, Gallo JM, Digmayer M, Povh JA. The semen qualitative characteristics and spermatozoa life time of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after hormonal induction. Biosci. J., Uberlândia. 2006; 22,3:119-125, <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6813>
- [17] Bombardelli RA, Hayashi C, Natali MRM, Sanches EA, Piana PA. Digestible energy level on reproductive and zootechnical performance and lipids deposition in hepatocytes of the Nile tilapia males. Brazilian Journal of Animal Science. 2010; 39:941-949. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000500001> 100 (accessed July 01, 2021).
- [18] Hafez ESE; Hafez B. Animal reproduction. 7. ed. Manole: São Paulo, 2004; 513.
- [19] Wilson-leedy JG, Ngermann RLI. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology. 2007; 67:661-672. 2007 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>
- [20] Adames MS, Toledo CPR, Neumann G, Buzzi AH, Buratto CN, Piana PA, Bombardelli RA. Optimization of the sperm:ooocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. Anim Reprod Sci. 2015; 161:119-28. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.08.014. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26364705.
- [21] Tessaro L, Toledo CPR, Neumann G, Krause RA, Meurer F, Natali MRN, Bombardelli RA. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed of different digestible energy levels in the reproductive phase. Aquaculture. 2012; 326-329:74-80. 2012 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.012>
- [22] Borges AM, Araujo KO, Pivato I, Navarro RD. Ultrastructure and sperm cryopreservation of the amazon catfish (*Leiarius marmoratus*) in captivity ro. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 2020; 72:253-262, <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10709>
- [23] Gheller MMS, Corcini CD, Brito CRC, Acosta IZ, Tavares GC, Soares SL; et al. Cryobiology Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian cat fish

Leiarius marmoratus. *Cryobiology*. 2018; 87: 74–77, <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.001>

[24] Riveros-pinilla DA, Ramírez-merlano JA, Sandoval-vargas LY, Mira-lópez TM, Cruz-cassallas PC, Medina-robles VM. Effect of hormone induction protocol in the spermiation and seminal characteristics of yaque (*Leiarius marmoratus*). *Orinoquia*. 2017; 21:34-40. ISSN 0121-3709. <https://doi.org/10.22579/20112629.392>.

[25] Araújo JÊ. Ribeiro ADP, Martins JSA, Souza EFF, Oliveira FN, Ribeiro CAL, et al. Ovopel and Carp Pituitary Extract as Spawning Inducers in Males of the Amazon Catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014; 57:882-886. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402469>

[26] Caneppele D. *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE): sperm production along a reproductive cycle. Postgraduate Program in Aquaculture and Fisheries. Fisheries Institute, APTA-SAA, São Paulo. 2011; 60.

[27] Simmons W. The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2005; 36: 125-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.112501>

[28] Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Station de Physiologie animale, / N. R. A., 78350 Jouy-en-Josas, France*. 1986; 26:877-920. https://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/1986/06/RND_0181-1916_1986_26_4_ART0001.pdf (accessed July 01, 2021).

[29] Billard R, Cosson MP. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh-water fish. *Journal of Experimental Zoology*. 1992; 261:122-131. <https://doi.org/10.1002/jez.1402610203>

[30] Rana K. Preservation of gametes. in N. R. Bromage, and R. J. Roberts, editors. *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science. 1995; 53-75.

[31] Toniolli R. Morphological aspects of swine spermatozoa, diluted into Beltsville extender added of acetic 3-indol acid. *Animal science*. 1999; 9:61-65.

[32] Rurangwa, EF, Volckaert AM, Huyskens G, Kime DE, OLLEVIER F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*. 2001;55:751-769. ISSN 0093-691X, [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00441-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00441-1).

- [33] Marques S, Godinho HP. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. *Braz. arch. biol. technol.* 2004; 47:799-804. ISSN 1678-4324. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500016>.
- [34] Pires LB, Sanches EA, Romagosa E, Corrêa filho RAC, Nass RAR, Lopera-barrero NM, et al. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after room-temperature and cold storage. *J Appl Ichthyol.* 2019; 35:747 - 753. <https://doi.org/10.1111/jai.13864>
- [35] Cosson J. Flagella parameters used as descriptors of fish spermatozoa motility. *Animal Reproduction. Science.* 2016; 169: 128-129. journal ISSN: 0378-4320 DOI 10.1016 / j.anireprosci.2016.03.078
- [36] Mehlis M, Bakker TCM. The influence of ambient water temperature on sperm performance and fertilization success in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolutionary Ecology.* 2014; 28:655-667. <https://doi.org/10.1007/s10682-014-9707-x>
- [37] Neumann G, Bernardes júnior JJ, Sanches PV, Piana PA, Bombardelli RA, 2017. Contribution of the CASA system, based on open source software, to the assessment of sperm characteristics: informatic and usage-based approaches. *Brazilian Journal of Animal Science.* 2017; 46(7):560-568. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000700002>
- [38] Chain PJ, Prough SG, Henig I, Tredway DR, Predictive value of sperm hyperactivation measurements based on the dilution effect method in clinical in vitro fertilization. *International journal of fertility.* 1992; 37:373-377, PMID: 1360460. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1360460/>. (accessed July 01, 2021)
- [39] Gallego V, Cavalcante SS, Fujimoto RY, Carneiro PCF, Azevedo HC, Maria NA. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*), *Theriogenology.* 2017; 87:16-24. ISSN 0093-691X, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.001>
- [40] Pires LB, Sanches EA, Romagosa E, Corrêa filho RAC, Streit jr DP, Nass RAR, Povh JA. Semen characteristics of *Colossoma macropomum* from three successive sample collections in the same reproductive cycle. *Aquaculture Research.* 2017; 48:5104–5110. <https://doi.org/10.1111/are.13329>
- [41] Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm

cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 2010; 74:551-556. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.018>

[42] Marcos RM, Neumann G, Toledo CPR, Sena JMS, Baumgartner G, Bombardelli RA. Seminal and spermatic characteristics of fresh semen and the effects of sperm cooling in *Steindachneridion melanodermatum* (Garavello, 2005) *Semina: Ciências Agrárias* 2015; 36:2:4493-4505. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4493

[43] Billard R, Cosson J, Perche G, Linhart O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 1995; 124:95-112. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00231-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00231-C)

[44] David LN, Cox MM, Lehninger A. Absolute Ultimate Guide for Lehninger Principles of Biochemistry. W.H Freeman and Company, New York., 2008

[45] Jenkins JA, Tiersch TR. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*. 1997; 28: 282–288. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1997.tb00644.x>

[46] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*. 1998; 163:163-181. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00243-9)

[47] Biak, I, Ottensen O, Rudolfson G, Johnsen S. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology*. 2016; 65:1587–1604.A1:B47

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O semêm refrigerado teve uma maior viabilidade no decorrer dos tempos de armazenamento quando comparado ao semêm armazenado em temperatura ambiente, a qualidade espermática neste ambiente foi decaindo no passar dos tempos, apresentando uma boa viabilidade espermática até as primeiras 12 horas.

A temperatura no armazenamento promoveu alterações na qualidade espermática. A temperatura alta acelerou a perda da viabilidade espermática, aumentando o metabolismo dos espermatozoides, diferente da temperatura baixa que reduziu o metabolismo dos espermatozoides e a sua degradação, prorrogando a viabilidade espermática por mais tempo.

Outros fatores que influenciam a qualidade espermática como a colonização por bactérias, ativação de algumas enzimas decorrente da alta da temperatura, efeito da temperatura nas taxas metabólicas e os parâmetros bioquímicos ainda são desconhecidos no semêm do *Leiarius marmoratus*, necessitando de mais pesquisa.

8 ANEXO

Tabela 1. Parâmetros espermáticos observados em *Leiarius marmoratus* imediatamente após coleta do sêmen.

| Parâmetros | N | Méd | DP |
|--|----------|------------|-----------|
| Volume seminal relativo (mL kg ⁻¹) | 5 | 0,21 | 0,07 |
| Motilidade espermática (%) | 5 | 89,09 | 5,39 |
| Velocidade curvilínear (µm s ⁻¹) | 5 | 61,08 | 7,71 |
| Velocidade média de deslocamento (µm s ⁻¹) | 5 | 43,31 | 9,04 |
| Velocidade em linha reta (µm s ⁻¹) | 5 | 41,41 | 9,04 |
| Velocidade espermática (µm s ⁻¹) | 5 | 48,51 | 9,88 |
| Retilinearidade (%) | 5 | 95,46 | 1,32 |
| Oscilação (%) | 5 | 71,78 | 6,77 |
| Progressão | 5 | 1698,27 | 364,32 |
| Frequência de batimento cruzado | 5 | 47,90 | 4,64 |
| Sobrevivência espermática (%) | 5 | 88,10 | 3,44 |
| Espermatozóides normais (%) | 5 | 78,20 | 6,72 |

n=número de amostras; Méd=médias; DP=desvio padrão

Fonte: Próprio autor