

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**RAQUEL SANTOS DOS SANTOS**

**CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ**  
**(*Rhamdia quelen*) CONTAMINADO COM SANGUE**

**Porto Alegre**

**2022**

**RAQUEL SANTOS DOS SANTOS**

**CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ  
(*Rhamdia quelen*) CONTAMINADO COM SANGUE**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, na  
Faculdade de Agronomia, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

**Porto Alegre- RS**

**Abril, 2022**

## CIP - Catalogação na Publicação

Santos dos Santos , Raquel  
CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ  
(Rhamdia quelen) CONTAMINADO COM SANGUE / Raquel  
Santos dos Santos . -- 2022.  
51 f.  
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Inovação em sistemas de produção animal. I.  
Streit Jr, Danilo Pedro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Raquel Santos Dos Santos  
Bióloga

## DISSERTAÇÃO

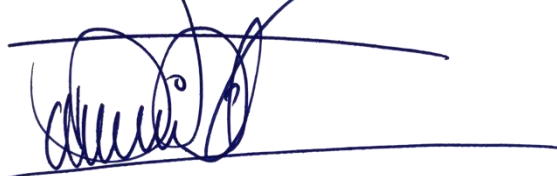
Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM ZOOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

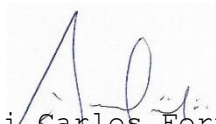
Aprovada em: 07.04.22  
Pela Banca Examinadora

Homologado em:  
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

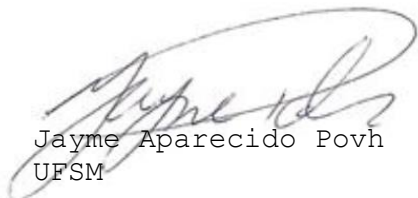
SERGIO LUIZ VIEIRA  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia



Darci Carlos Fornari  
Universidade de Auburn - Alabama/USA



Eduardo Antônio Sanches  
UNESP



Jayme Aparecido Povh  
UFSM

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de Agronomia

## Agradecimentos

Durante essa experiência do mestrado, tive a honra de poder contar com várias pessoas que me forneceram subsídio emocional e acadêmico para a realização dessa dissertação, e gostaria de agradecê-los.

Meus pais, que me incentivaram a sempre buscar o conhecimento e apoiaram meus sonhos, embora preocupados e sendo privados de minha presença em muitos momentos importantes para nós. Meus irmãos, por me consolarem nas horas difíceis em que tive dúvidas sobre continuar, me despertando persistência e foco. Eu amo vocês, são a minha força.

Ao Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr, pela confiança e disposição, sou imensamente grata pelas orientações, pelos conselhos e pela paciência, por dividir um pouco de seu conhecimento e pela força com a qual enfrenta muitas dificuldades pela ciência e por nós, alunos.

À Lis Marques, Rômulo Rodrigues e Tales França e Itamar Cossina, pelas orientações acadêmicas e apoio oferecidos em todos os momentos que precisei, talvez vocês não saibam de fato o quanto me ajudaram nessa experiência, eu serei sempre grata por ter conhecido profissionais tão completos, sem vocês essa dissertação não seria possível.

Aos demais colegas do AQUAM, obrigada pelo companheirismo desde um café cotidiano no laboratório em dias calmos, às madrugadas frias de indução e alimentação das larvas, por estarem engajados comigo nos preparativos dos experimentos realizados, vocês foram cruciais neste trabalho.

Aos amigos que aqui fiz, e aos que mesmo longe, sempre estiveram por perto. Casa amarela, obrigada por me acolher em Porto Alegre e se tornar família aqui.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela estrutura e suporte para a realização deste trabalho.

Também agradeço a banca avaliadora desta dissertação, pela disponibilidade, sugestões e contribuições com o aprendizado.

Agradeço infinitamente a Deus, por me ajudar a concluir mais uma meta da minha vida, por estar me guiando e me mostrando os meios para vivenciar o novo e evoluir.

## CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) CONTAMINADO COM SANGUE<sup>1</sup>

Autora: Raquel Santos dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

**Resumo:** No manejo da reprodução artificial de peixes é comum haver contaminação dos gametas devido a liberação de sangue, e o risco de declínio na qualidade das amostras leva ao descarta do material. O objetivo deste estudo, foi avaliar as características qualitativas do sêmen de *R. quelen* contaminado com 5% e 10% de sangue. Para isso, um *pool* de sêmen obtido de 13 machos ( $378 \pm 0,31$  g) foi distribuído em dois tratamentos contaminados (5% e 10% de sangue) e controle. Os parâmetros cinéticos do sêmen foram avaliados utilizando o Sistema de Análise Espermática Computadorizada. A Morfologia espermática e a Integridade da membrana foram avaliadas pelos métodos de coloração Rosa de Bengala, e Eosina-Nigrosina, respectivamente. Para a fertilização foi utilizada dose inseminante mínima de 70 mil espermatozoides móveis por oócito, e as taxas de Fertilização, Eclosão e Morfologia larval, foram obtidas com auxílio de contador manual. Foram realizadas sete réplicas em um delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram analisados estatisticamente considerando 5% de significância entre os grupos. A porcentagem de espermatozoides móveis observada no grupo controle foi maior ( $78,64 \pm 6,90\%$ ), quando comparada aos grupos com 5% de sangue ( $67,83 \pm 7,95$ ) e 10% de sangue ( $68,87 \pm 3,40\%$ ), porém, não houve diferença nos parâmetros de motilidade (LCV, VAP, VSL, STR, WOB, PROG e BCF =  $p > 0,05$ ). A porcentagem de espermatozoides com morfologia normal foi maior no grupo controle ( $81 \pm 3,32\%$ ), quando comparado ao grupo com 10% de sangue ( $72,07 \pm 5,04\%$ ), enquanto o grupo com 5% de sangue não diferiu dos demais, com  $76 \pm 3,19\%$  de espermatozoides normais. Não houve diferença entre os grupos experimentais para integridade de membrana ( $p=0,2547$ ). Também não houve diferença entre os grupos experimentais para taxa de fertilização ( $p=0,2808$ ), taxa de eclosão ( $p=0,3451$ ) e larvas normais ( $p=0,4262$ ). Esses resultados sugerem que a contaminação com 5 ou 10% de sangue não afeta os parâmetros de qualidade e a capacidade de fertilização de *R. quelen*, sendo necessário atenção quanto a dose inseminante.

**Palavras-chave:** sêmen de peixes, qualidade seminal, hemospermia, motilidade espermática, dose inseminante.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Inovação em sistemas de produção animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (52 p.)  
Abril, 2022.

## QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF JUNDIÁ SEMEN (*Rhamdia quelen*) CONTAMINATED WITH BLOOD<sup>2</sup>

Author: Raquel Santos dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

**Abstract:** In the process of artificial reproduction of fish, during the collection of gametes blood may be released, causing the contaminated samples to be discarded. The aim of this study was to evaluate the qualitative characteristics of *R. quelen* semen contaminated with 5% and 10% blood. For this, a pool of semen obtained from 13 males ( $378 \pm 0.31$  g) was distributed in two contaminated treatments (5% and 10% blood) and control. Semen kinetic parameters were evaluated using the Computerized Sperm Analysis System. Rose Bengal and Eosin-Nigrosin staining methods, respectively evaluated sperm Morphology and Membrane Integrity. For fertilization, a minimum inseminating dose of 70,000 mobile sperm per oocyte was used, and the rates of fertilization, hatching and larval morphology were obtained with the aid of a manual counter. Seven replicates were performed in a completely randomized design, and the data were statistically analyzed considering a 5% significance level between the groups. The percentage of motile spermatozoa observed in the control group was higher ( $78.64 \pm 6.90\%$ ), when compared to the groups with 5% blood ( $67.83 \pm 7.95$ ) and 10% blood ( $68.87 \pm 7.95$ ).  $3.40\%$ ), however, there was no difference in the motility parameters (LCV, VAP, VSL, STR, WOB, PROG and BCF =  $p > 0.05$ ). The percentage of sperm with normal morphology was higher in the control group ( $81 \pm 3.32\%$ ), when compared to the group with 10% blood ( $72.07 \pm 5.04\%$ ), while the group with 5% blood did not differ from the others, with  $76 \pm 3.19\%$  of normal sperm. There was no difference between the experimental groups for membrane integrity ( $p=0.2547$ ). There was also no difference between the experimental groups for fertilization rate ( $p=0.2808$ ), hatching rate ( $p=0.3451$ ) and normal larvae ( $p=0.4262$ ). These results suggest that contamination with 5 or 10% of blood does not affect the quality parameters in order to nullify the fertilization capacity and reproductive efficiency of fresh semen of *R. quelen*, and it also alert to the trend of lower mobile cell rates, requiring attention to the motile sperm:oocyte ratio.

**Keywords:** Fish semen; hemospermia, spermatozoa motility, sperm quality, sperm:oocyte ratio.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Animal Science –Inovação em sistema de produção animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (52 p.) Abril, 2022.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
2.1 Situação atual da piscicultura no Brasil .....	11
2.1. Reprodução de espécies nativas em cativeiro .....	11
2.2. Contaminação biológica do sêmen de peixes.....	13
2.4 Contaminação biológica do sêmen de peixes com sangue.....	14
2.5 Aspectos da qualidade e métodos de avaliação seminal em peixes .....	18
2.6 Jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	20
<b>CAPÍTULO 2- Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Aquaculture. ....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>23</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>24</b>
2.1 Ethics statement.....	24
2.2 Initial milt assessment and pool preparation .....	26
2.3 Experimental design.....	26
2.4 Blood collection and sample contamination .....	27
2.5 Milt assessments.....	27
<b>2.5.1 Concentration sperm</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.2 Kinetics parameters (CASA)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.3 Morphology spermatozoa</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5.4 Plasma Membrane Integrity</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5.5 Fertilization, hatching, and normal larvae</b> .....	<b>29</b>
2.6 Statistical analysis .....	29
<b>3. RESULTS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Aspects of the samples and Concentration milt .....	30
3.2 Kinetics parameters milt (CASA) .....	30
3.3 Morphology spermatozoa.....	32
3.4 Plasma Membrane Integrity .....	34
3.5 Fertilization, hatching, and normal larvae.....	35
<b>4. DISCUSSION</b> .....	<b>36</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>40</b>
<b>Competing interests statement</b> .....	<b>40</b>
<b>Funding sources</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>41</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
<b>VITA</b> .....	<b>52</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Em peixes a qualidade do sêmen é um fator determinante para o sucesso reprodutivo, e no Brasil a produção pesqueira é atualmente a maior entre todos os países da América do sul. A reprodução artificial de peixes é uma atividade frequente tanto em laboratórios de pesquisas, quanto no setor produtivo, e as técnicas utilizadas no manejo reprodutivo podem ser divididas em duas: indução ambiental, consiste na simulação dos fatores abióticos em criadouros, e indução hormonal, consiste na administração de hormônios estimulantes da maturação final e espermiação/ovulação dos peixes.

A indução hormonal permite a coleta dos gametas pela papila urogenital através do procedimento chamado extrusão, massagem abdominal de baixa pressão ao longo dos ductos seminíferos, no sentido céfalo-caudal do peixe. Durante a extrusão do sêmen, é comum ocorrer contaminação dos espermatozoides através da eliminação de urina, fezes, ou sangue, e pode afetar negativamente a qualidade seminal, comprometendo, portanto, a utilização do material coletado, sendo então descartado (CIERESZKO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2021).

Essa contaminação está relacionada com a falta de padronização na técnica de coleta para espécies nativas (CAROLSFELD *et al.*, 2003), com as distintas morfologias gonadais e até mesmo com volume de sêmen produzido pela espécie. Espécies que produzem e liberam maiores volumes de sêmen, apresentam menores chances de liberar sangue no momento de coleta, e caso aconteça a amostra poderá ser substituída com uma nova coleta, é o que ocorre por exemplo com as espécies *Rhamdia quelen* e *Brycon orbignyanus*, pois liberam um volume relativamente alto de sêmen na extrusão (> 5 ml).

Por outro lado, há espécies nativas que liberam um baixo volume de sêmen, e para a obtenção dos espermatozoides evitando contaminação é necessário o sacrifício dos peixes para extração dos testículos. É o que ocorre com o *Leporinus macrocephalus* e *Zungaro jahu*, ambas ameaçadas de extinção em vários estados do Brasil (VIVEIROS e GODINHO, 2009; MACHADO *et al.*, 2008). O sacrifício desses peixes com status ameaçado intensificam a necessidade de medidas que mitiguem tal situação, visto que há muitas outras espécies na mesma condição de risco em todo o mundo (PALACIOS-ABRANTES *et al.*, 2020).

A influência da contaminação do sêmen com sangue sobre a eficiência reprodutiva dos peixes ainda não está bem estabelecida. Pesquisadores mostraram que essa condição levou ao declínio nos parâmetros de motilidade e fertilização (BOBE e LABBÉ, 2008). No entanto há também observações em que a contaminação com sangue não influenciou nesses parâmetros,

ou influenciou apenas em amostras que foram criopreservadas (MARQUES *et al.*, 2021; CIERESZKO *et al.*, 2004). Tais resultados sugerem ainda que pode haver uma relação proporcional entre o nível de contaminação e o declínio nas variáveis de produção, nesse contexto, estudos pioneiros apontam que a contaminação com baixas concentrações de sangue não influenciam nos parâmetros de qualidade do sêmen dos peixes (SATTERFIELD, 1995; BOWEN *et al.*, 1986).

Diante da inconsistência quanto à influência do sangue nos parâmetros de qualidade do sêmen e na prole, o material coletado é imediatamente descartado sendo necessário uma nova coleta, ou partindo-se para outros meios de obtenção dos gametas, como sacrifício dos animais, o que impacta de forma direta tanto na diversidade biológica, agravando a situação de espécies em risco, quanto nos esforços financeiros aplicados pelos piscicultores e instituições para obtenção e manutenção de matrizes.

Ademais, no presente estudo optamos por utilizar um animal nativo com status de conservação não ameaçado para então subsidiar aspectos da reprodução artificial utilizando sêmen contaminado com sangue. O jundiá-cinza (*Rhamdia quelen*) compõe um grupo de peixes estabelecidos como modelos experimentais no país e está presente em várias linhas de pesquisa (BRASIL, 2019), a espécie se destaca no setor comercial, possui fácil manejo e reprodução artificial bem estabelecida fora de seu hábitat natural. Nesse contexto, o objetivo do nosso estudo é fornecer respostas sobre a presença do sangue no sêmen e suas consequências na reprodução, através de avaliação das características qualitativas do sêmen de *R. quelen* contaminado com 5% e 10% de sangue.

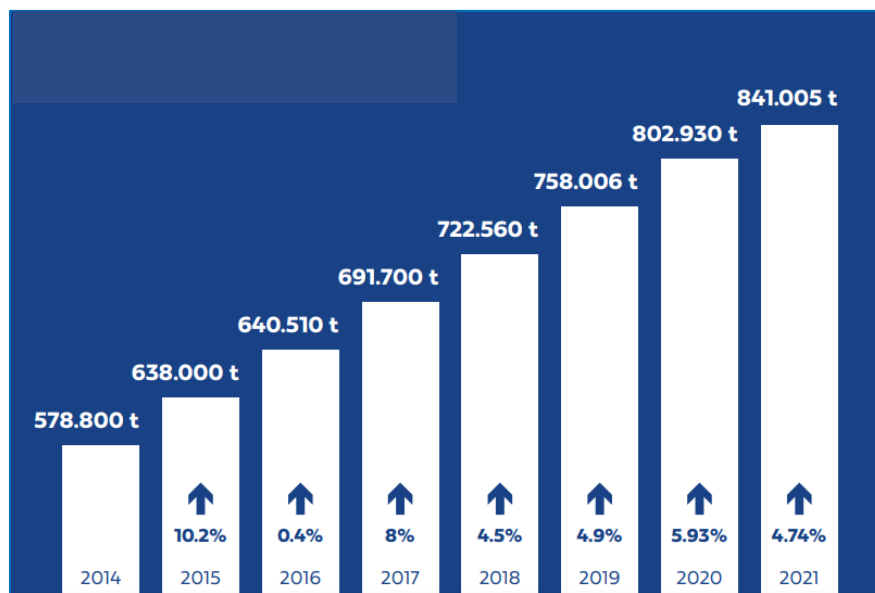
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Situação atual da piscicultura no Brasil

O consumo de peixe no mundo tem sido uma pauta importante, visto que a proteína do pescado implementa uma dieta saudável o consumo humano tem aumentado e nota-se o aprimoramento das técnicas usadas neste manejo, tendo sido identificada uma rápida melhoria da situação de certas populações de peixes, como resultado de uma melhor gestão da pesca.

De acordo com os últimos relatórios da FAO (2018, 2020) e levantamentos feitos pelo IBGE e PeixeBR em 2022, o Brasil é destaque mundial na produção de peixe. O país produziu 841.005 toneladas de peixes em 2021, e mantém média de crescimento de 5,6% a cada ano, o que não é observado em outro setor de produção de proteína animal (Fig.).

**Figura 1.** Produção do pescado cresce 4,74% em 2021, acumulando 45% de aumento desde 2014.



Fonte: Anuário PeixeBR, 2022.

#### 2.1. Reprodução de espécies nativas em cativeiro

Há uma grande diversidade de espécies nativas da América do Sul, classificadas como espécies neotropicais, que por sua vez, apresentam diferentes estratégias reprodutivas, necessitando de condições específicas para sua reprodução (GALO *et al.*, 2015).

Algumas dessas espécies ao identificar a chegada da estação reprodutiva fazem longas jornadas, vencendo obstáculos naturais, tais como cachoeiras e corredeiras, enfrentam também os obstáculos impostos pelo homem, tais como barragens hidrelétricas. Este fenômeno é denominado migração/piracema e é biologicamente complexo e necessário para o desenvolvimento e maturação dos gametas nesses peixes, possibilitando a desova, ou seja a reprodução, e se iniciam devido a sinalizadores ambientais naturais recebidos pelos peixes, como chuvas, fotoperíodo e temperatura (GODINHO *et al.*, 2007; BARBIERI *et al.*, 2000).

Como exemplo de espécies neotropicais migradoras podemos citar dourados, pacus, curimatás, tambaquis, tabaranas, dentre outras. Entretanto, outras espécies como lambari, traíras, pirarucus, tucunarés, carás e tilápias se reproduzem em águas paradas (ambientes lênticos). Essa diferença no comportamento reprodutivo classifica os peixes em dois tipos, espécies sedentárias e migradoras, ainda que algumas espécies possam apresentar padrão intermediário.

Entretanto, as espécies migradoras não reproduzem naturalmente fora de seu ambiente natural, pois em cativeiro não existe estímulo para a resposta endócrina apropriada que leve à maturação final das gônadas, havendo apenas um desenvolvimento parcial destas (MURGAS *et al.*, 2011). Para concluir essa maturação, é necessária intervenção artificial, por meio da simulação de condições ambientais favoráveis à reprodução, e utilização de hormônios específicos (RIBEIRO, MOREIRA, 2014), como por exemplo, o extrato bruto de hipófise de carpa, considerado o mais comum neste manejo.

A indução hormonal permite a liberação e coleta dos gametas através do procedimento chamado extrusão, que consiste em uma massagem abdominal de baixa pressão, no sentido céfalo-caudal do peixe (VIVEIROS, GODINHO, 2009). Muito embora a técnica de reprodução induzida tenha sido descoberta desde a década de 30 no processo de desova artificial com o uso de hipofisção (IHERING, WRIGHT, 1935), a sua popularização ocorreu no país no fim dos anos 70. Todavia, o seu desenvolvimento continua em ritmo lento frente a outras atividades relacionadas à piscicultura de espécies nativas.

No Brasil, o hormônio mais utilizado para a indução da reprodução pela maturação final de peixes é o extrato bruto de hipófise de peixes maduros. A indução hormonal com extrato hipofisário. Esse manejo também pode ser utilizado para aumentar a produção seminal, antecipar o período reprodutivo, restringi-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote de matrizes (ANDRADE, YASUI, 2003), permitindo a utilização de um menor número de machos, e uso racional do plantel de reprodutores (CARNEIRO, 2007). Na realização da reprodução artificial, durante a coleta dos gametas nos machos pelo método de extrusão, é

comum ocorrer contaminação biológica do sêmen através da eliminação de urina, fezes, ou sangue (CIERESZKO *et al.*, 2004).

## 2.2. Contaminação biológica do sêmen de peixes

A contaminação biológica do sêmen do peixe pode diminuir o sucesso da fertilização, e, se tratando da presença dos contaminantes recorrentes no manejo reprodutivo em cativeiro, fezes e urina são bem abordados na literatura, e é comprovada a presença de efeitos deletérios à qualidade do sêmen na presença de ambos. Essa contaminação ocorre, em geral, sob as condições de coleta por compressão abdominal, pois o ducto espermático e o urinário se juntam no ducto eferente com uma abertura através da papila urogenital (NYNCA *et al.*, 2012).

A contaminação do sêmen de *Sander vitreum* com fezes, por exemplo, reduziu em 2 dias o período de estocagem e o tempo de duração de motilidade de 51 s (controle) para 5,6 segundos (SATTEFIELD, FLICKINGER, 1995). Estudos recomendam que a contaminação por fezes deve ser evitada, para prevenir um significativo decréscimo do período de armazenamento do sêmen refrigerado e do tempo de duração de motilidade, pois altas quantidades de microorganismos saprófitos tais como coliformes, enterobacteriaceae e enterococos podem competir com espermatozoides pelos nutrientes presentes no plasma seminal ou nos diluidores, ou ambos, reduzindo a qualidade do sêmen e, conseqüentemente, a fertilidade (BOONE, HUGHES, 1970). Os microorganismos podem causar um efeito deletério, diretamente, ao causar danos à estrutura espermática (DIEMER *et al.*, 1996) ou, indiretamente, ao estimular a produção de anticorpos que podem agir contra os espermatozoides (KURPISZ, ALEXANDER, 1995).

A contaminação com urina também possui grande influência sobre a qualidade dos espermatozoides de peixes de água doce. A motilidade espermática pode ser ativada durante a coleta liberação de urina e, desta forma, determinar alterações nos índices de fertilização, pois com a motilidade precocemente desencadeada, no momento da fertilização os espermatozoides não possuem mais energia suficiente para atravessar a micrópila e fertilizar os oócitos (BILLARD *et al.*, 1995). A baixa osmolaridade da urina, possivelmente seja responsável por uma ativação precoce dos espermatozoides no trato urinário, o que induz uma redução inicial do armazenamento de energia intracelular (POUPARD *et al.*, 1998) e, caso ocorra uma demora para o sêmen entrar em contato com os oócitos, os espermatozoides podem estar imóveis no momento da fecundação (RURANGWA *et al.*, 2004). No sêmen de tenca (*Tinca tinca*), por exemplo, houve ativação precoce devido a contaminação com urina, ativando em até 100% dos espermatozoides antes do momento da fertilização (LINHART *et al.*, 2003). Mas, de acordo

com os autores, esta ativação precoce pode ser prevenida no momento da coleta, utilizando mas solução imobilizadora, que venha apresentar a mesma osmolaridade do sêmen da espécie.

A contaminação do sêmen de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a partir de 0 a 30% de urina, levou à redução da osmolaridade do plasma seminal, de 301 para 203 mOsm/kg de solvente, respectivamente (NYNCA *et al.*, 2012). Em tilápias (*Oreochromis mossambicus*) a urina foi considerada uma boa ativadora da motilidade espermática (LINHART *et al.*, 1999). A redução da motilidade espermática em amostras contaminadas por urina também foi observada em pregado (*Psetta maxima*) (DREANNO *et al.*, 1998) e em *C. carpio* (BILLARD *et al.*, 1995; POUPARD *et al.*, 1998). Segundo Poupard *et al.* (1998), a contaminação do sêmen por urina em peixes, durante a coleta, pode ser evitada por uma leve compressão do abdômen antes de iniciar-se o procedimento e, em seguida, pela introdução de um cateter na bexiga urinária, para recolher a urina remanescente.

Este método pode ser utilizado para coletar sêmen livre de contaminação por urina, sangue e fezes (CABRITA *et al.*, 2001). Em contrapartida, Cierezsko *et al.* (2004) afirmam ser impossível evitar a contaminação com urina pela utilização deste método, mesmo que seja realizado com cuidado. Consideram que, apesar de ser um procedimento minimamente traumático e não causar hemorragia, é possível que ocorra introdução de bactérias no ducto espermático ou ainda produza danos ao ducto espermático do peixe.

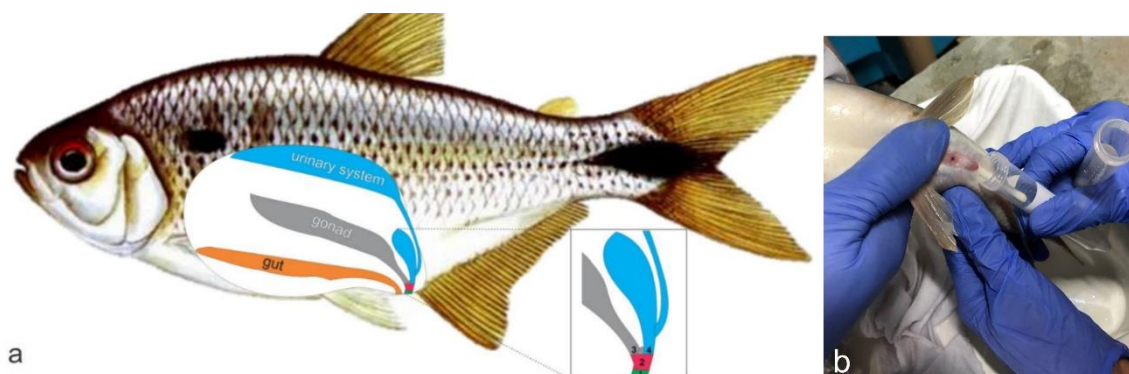
#### **2.4 Contaminação biológica do sêmen de peixes com sangue**

Em mamíferos, a presença de sangue visível no sêmen é uma condição diagnosticada como hemospermia, e traz consigo o estigma de queda na fertilidade ou infertilidade, entretanto, muitos estudos estão mostrando que não é mera presença do sangue que afeta negativamente a qualidade seminal dos mamíferos, mas sim o tempo de exposição e a concentração de sangue presente, que mostram uma relação proporcional com declínio nos parâmetros de qualidade seminal (Andrade Jr 2017; Turner *et al.*, 2016).

Entretanto para os peixes, essa contaminação ainda é subjugada, pois não ativa a motilidade, não causa crescimento bacteriano e não há resultados em relação a influência dessa contaminação na prole dos animais. Ainda assim, diante do risco de declínio na qualidade da reprodução, o sêmen coletado quando contaminado com sangue, é imediatamente descartado, o que pode ser notado inclusive, em muitos relatos na literatura.

Esse tipo de contaminação é facilitado devido à organização interna dos ductos seminíferos dos peixes, que variam muito entre as espécies. Na figura abaixo (Fig.2), é possível observar a configuração dos ductos seminíferos e urinários (Fig. 2a), e o momento da coleta do sêmen pelo método de extrusão (Fig. 2b).

**Figura 2.** Posição da papila urogenital em relação ao corpo do peixe: 1) abertura do ducto Urogenital; 2) divisão do ducto urogenital em ducto genital e urinário; 3) ducto genital; 4) ducto urinário. b) Procedimento de coleta do sêmen em *R. quelen*, método de extrusão dos gametas.



**Fonte:** a) Siqueira-Silva, 2015; b) Arquivo pessoal.

Essa contaminação está relacionada com a falta de padronização na técnica de coleta para espécies nativas (CAROLSFELD *et al.*, 2003), com as distintas morfologias gonadais e até mesmo com volume de sêmen produzido pela espécie. Espécies que produzem e liberam maiores volumes de sêmen, apresentam menores chances de liberar sangue no momento de coleta, e caso aconteça a amostra poderá ser substituída com uma nova coleta, é o que ocorre por exemplo com as espécies *Rhamdia quelen* e *Brycon orbignyianus*, pois liberam um volume relativamente alto de sêmen na extrusão (> 5 ml).

Por outro lado, há espécies nativas que liberam um baixo volume de sêmen, e para a obtenção dos espermatozoides evitando contaminação é necessário o sacrifício dos peixes para extração dos testículos. É o que ocorre com o *Leporinus macrocephalus* e *Zungaro jahu*, ambas ameaçadas de extinção em vários estados do Brasil (VIVEIROS e GODINHO, 2009; MACHADO *et al.*, 2008). O sacrifício desses peixes com status ameaçado intensificam a necessidade de medidas que mitiguem tal situação, visto que há muitas outras espécies na mesma condição de risco em todo o mundo (PALACIOS-ABRANTES *et al.*, 2020).

Estudos têm mostrado que a contaminação com sangue não causa a ativação dos espermatozoides, como ocorre na presença de urina no sêmen (CIERESZKO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2021), ou proliferação bacteriana, diminuição da motilidade e danos ao DNA dos espermatozoides (SATTEFIELD, 1995; CIERESZKO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2021).

Alguns estudos sugerem ainda, que a adição de sangue ao sêmen de peixes pode aumentar a duração da motilidade em amostras armazenadas em resfriamento, (SATTEFIELD, 1995; CIERESZKO *et al.*, 2014) enquanto Marques *et al.* (2021) relata que amostras contaminadas com sangue podem não comprometer a qualidade do sêmen fresco, porém, não devem ser usadas para criopreservação, pois possuem efeitos prejudiciais à qualidade do esperma. Entretanto não foram avaliadas análises na qualidade da prole, ou de diferentes concentrações de contaminação para peixes, como ocorre para mamíferos (Tab. 1).

**Tabela 1.** Principais estudos sobre a influência da contaminação do sêmen com sangue

<b>Autor</b>	<b>Resultados</b>	<b>Em estudo</b>
Janey <i>et al.</i> , 2002	Aumento dos níveis de estresse oxidativo.	<b>Mamíferos</b>
Zalata <i>et al.</i> , 1998	O estresse oxidativo induzido por células brancas do sangue, com efeito do envelhecimento e diminuição da fluidez da membrana e afetando a motilidade.	<b>Mamíferos</b>
Rijsselaere <i>Et. al</i> 2004	Os efeitos prejudiciais do sangue nos espermatozoides criopreservado são atribuídos à alta quantidade de hemoglobina proveniente da hemólise de hemácias observada após o congelamento e descongelamento.	<b>Mamíferos</b>
Voss <i>et al.</i> , 1976	A presença de 20% de sangue afetou na fertilização e na motilidade causando ainda efeitos deletérios ao sêmen.	<b>Mamíferos</b>
Bowen <i>et al.</i> , 1986	5% de sangue não apresentou influência nos parâmetros qualitativos do sêmen.	<b>Mamíferos</b>
Ciereszko <i>et al.</i> , 2004	Contaminação com sangue não influenciou a motilidade espermática, concentração de proteína e atividade de LDH do sêmen armazenado.	<b>Peixes</b> <i>Oncorhynchus mykiss</i>
Marques <i>et al.</i> , 2021	Contaminação com 10% de sangue não afetou os parâmetros de qualidade no sêmen fresco, porém teve efeitos prejudiciais na qualidade do esperma criopreservado.	<b>Peixes</b> <i>Colossoma macropomum</i>
Bobé, Labbé ,		<b>Peixes</b>



2009	A presença de células sanguíneas no sêmen de peixes podem aumentou os níveis estresse oxidativo.	*
Satterfield, 1995	A contaminação com sangue aumentou significativamente o tempo de armazenamento resfriado e a motilidade do sêmen.	<b>Peixes</b> <i>Stizostedion vitreum</i>
Le <i>et al.</i> , 2018	A motilidade e a duração da motilidade dos espermatozoides contaminados com sangue foram superiores aos espermatozoides contaminados com água do mar, e também não foram significativamente diferentes dos espermatozoides do grupo controle.	<b>Peixes</b> <i>Stereolepis doederleini</i>

\* as espécies não foram especificadas

Em equinos observou-se que a presença de 20% de sangue causou efeitos deletérios aos espermatozoides comprometendo a motilidade das células e portando, a fertilização (VOSS *et al.*, 1976), enquanto concentrações mais baixas dessa contaminação não influenciaram ambas as taxas (BOWEN, 1868). Um estudo em porcos elucidou recentemente que a presença de até 5% de sangue não foi prejudicial para a qualidade do sêmen e da prole em suínos (LEROY, 1999).

A presença de células sanguíneas no sêmen de peixes também pode estar relacionada com diferentes eventos, fisiológicos ou patológicos, no trato reprodutivo masculino (CIERESZKO *et al.*, 2004), tais como:

- a) Pequenas quantidades destas células podem estar relacionadas com a fisiologia normal do animal;
- b) Uma pequena quantidade de sangue pode estar presente devido a lesões causadas pelo manuseio dos peixes, ou adquiridas durante a migração reprodutiva.
- c) Hemorragias no trato reprodutivo podem, muitas vezes, ocorrer na piscicultura devido à grande densidade de peixes, manejo dos reprodutores e à coleta de sêmen por compressão abdominal. A ocorrência de hemorragia pode ser indicada pela presença de eritrócitos no sêmen;
- d) Inflamações do trato reprodutivo;
- e) Consequência de eventos relacionados com a involução do sistema reprodutivo após a ejaculação.

Um número elevado de células sanguíneas, eritrócitos e células linfoides pode ser encontrado em algumas amostras de sêmen, apesar de uma falta de quaisquer sinais visíveis de contaminação com sangue. A contaminação do sêmen por pequena quantidade de sangue parece não prejudicar gravemente a qualidade seminal (CIERESZKO *et al.*, 2004).

## 2.5 Aspectos da qualidade e métodos de avaliação seminal em peixes

Devido à particularidade de cada espécie e até mesmo entre a mesma espécie, o conhecimento das características seminais é extremamente importante para determinar a qualidade reprodutiva destes animais, e desta forma, aperfeiçoar o uso destas técnicas para a utilização em sistemas de reprodução artificial em larga escala (MURGAS *et al.*, 2011). O conhecimento do perfil espermático de uma espécie apresenta várias vantagens, entre elas o melhor aproveitamento dos gametas e a produção de um maior número de embriões viáveis.

O volume de sêmen produzido pelas diferentes espécies, ou entre animais de uma mesma espécie, é muito variável, e pode sofrer influência de vários fatores, como a estação do ano, o período reprodutivo e o clima.

A concentração de espermatozoides, é definida como o número de espermatozoides/mL, é altamente variável nas espécies de peixes neotropicais (VIVEIROS e GODINHO, 2009), e geralmente é avaliada através da contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer, sendo uma importante informação para a otimização do uso do sêmen em processos de desova induzida. A densidade pode variar de acordo com o peso ou idade do peixe, época do período reprodutivo, frequência de coleta e volume coletado (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

A análise da motilidade espermática é apontada por diversos autores como uma importante ferramenta para análise espermática, consisti na determinação da porcentagem espermatozoides móveis, e dos parâmetros pautados nos padrões com que essas células se movimentam, é o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (BILLARD, COSSON 1992). As estimativas da taxa de motilidade são avaliadas observando-se a movimentação dos espermatozoides imediatamente após a introdução de uma solução ativadora, pois o tempo de motilidade geralmente é curto.

Atualmente o programa CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*) tem sido amplamente utilizado na determinação da variabilidade de movimentação espermática. Este sistema foi usado pela primeira vez na pesquisa de esperma de mamíferos em 1974 e tornou-se uma alternativa para análises espermáticas em outros vertebrados (KOWALSKI e CEJKO, 2019). A técnica começou a ser aplicada em gametas de peixes em 1995, difundindo-se lentamente desde então, sendo utilizado para avaliar parâmetros como por exemplo a velocidade média percorrida pela célula espermática (VAP,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), velocidade média da célula em linha reta (VSL,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), progressão no percurso realizado (PROG,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), entre outros indicadores de motilidade, pois permite que as células sejam contadas e analisadas com facilidade e rapidez.

A avaliação subjetiva da qualidade motilidade espermática pode ser afetada pela observação pessoal, e a porcentagem de espermatozoides móveis e a duração do movimento podem ser superestimadas ou subestimadas, o que levará a grandes erros quando diferentes pessoas conduzirem os experimentos.

Os espermatozoides de peixes são morfológicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda (COSSON *et al.*, 1999). A morfologia espermática tem sido utilizada principalmente para identificar e quantificar deformidades ou anomalias. Essas alterações podem ser relacionadas com resultados da espermatogênese, enfermidades, restrição alimentar ou estresse ambiental (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas próxima e distal) ao procedimento de manejo durante a coleta do sêmen (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia e microcefalia) (COSTA *et al.*, 2019). A avaliação é feita através de esfregaços corados, sendo o Rosa de Bengala, um dos meios de coloração mais relatado na literatura (STREIT *et al.*, 2004). De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), animais com índice de anormalidades espermáticas acima de 30% em bovinos e equino e de 20% em ovinos e suínos não são recomendados para procedimentos de inseminação artificial ou monta natural, podendo comprometer a fertilidade e eficiência reprodutiva. A inexistência de tais parâmetros para peixes, a porcentagem aceitável de patologias para peixes ainda não foi determinada.

A integridade de membrana é um importante aspecto de qualidade espermática, pois ela confere ao espermatozoide a funcionalidade adequada e necessária para a fertilização. Danos à membrana espermática resultam em queda na eficiência da reprodução. As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade, interações entre o espermatozoide e epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito, além de garantir a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios interno e externo (PEÑA *et al.*, 2005). A análise da integridade da membrana plasmática utilizando a coloração eosina-nigrosina classifica os espermatozoides como viáveis inviáveis, e é baseada na permeabilidade celular e, portanto espermatozoides viáveis (vivos) permanecem incolores enquanto os não viáveis (mortos) permitem a penetração do corante corando a célula em rosa.

## 2.6 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

Entre as espécies de peixes brasileiras que ocorrem exclusivamente em ambientes de água doce, a ordem Siluriforme constitui um grupo de peixes que se divide em 11 famílias, compostas por 1045 espécies (BUCKUP *et al.*, 2007). Dentro dessa ordem, o Jundiá cinza (*Rhamdia Quelen*), apresentado na figura abaixo (Fig. 2) é um bagre carnívoro do gênero *Rhamdia*, com grande popularidade entre os produtores de peixes devido ao seu apelo comercial, pois apresenta carne saborosa e sem espinhos intramusculares, sendo bem aceito pelo consumidor, e também pelo fácil manejo em cativeiro, com alta produção de alevinos ocorrendo entre os meses de agosto a março (BALDISSEROTTO, NETO, 2004).

**Figura 3.** Exemplar macho de jundiá, *Rhamdia quelen* adulto.



**Fonte:** Thales França (2020).

A criação de jundiá é uma importante atividade econômica, geradora de alimento e renda nas pequenas comunidades agrícolas da região sul. Seu cultivo tanto em viveiro escavo como em tanques-rede, vem crescendo nos últimos anos e apresentando ótimos resultados, com crescimento durante todas as estações do ano, inclusive no inverno, onde continua se alimentando (GRAEFF, 2013).

Por ser uma espécie nativa de ampla ocorrência na América do Sul, fácil manejo e reprodução artificial bem estabelecida em cativeiro, o Jundiá vem sendo utilizado em diversos estudos em diferentes áreas, como por exemplo: controle e prevenção de patógenos em peixes (COACCI, 2017; NEGRELLI *et al.*, 2019), uso de probióticos no melhoramento da reprodução em cativeiro (Rodrigues *et al.*, 2020), parâmetros hematológicos diante de estresse agudo e crônico em peixes (Barcellos *et al.*, 2004), nutrição (BOMBARDELLI *et al.*, 2020), toxicologia (GOMES *et al.*, 2021), reprodução (HILBIG *et al.*, 2019), conservação de gametas de espécies neotropicais (GOES *et al.*, 2017) e procedimentos anestésicos (CORSO *et al.*, 2019), entre outros, pelo que a espécie atualmente compõe um grupo de peixes que são utilizados no Brasil como modelos experimentais (BRASIL, 2019).

A utilização desse animal para obter respostas sobre a influência da contaminação do sêmen com sangue, irá ajudar a compreender pontos negativos e positivos até mesmo de se congelar esse material e utilizá-lo no futuro, subsidiando estudos de produção em cativeiro e contribuindo com outras espécies sem comprometer a diversidade biológica de peixes nativos em risco. Ademais, considerando que a qualidade dos espermatozoides dos peixes é a condição primordial para uma boa fertilização, e conseqüentemente a produção e perpetuação das espécies (DADRAS *et al.*, 2019), faz-se necessário compreender como a contaminação biológica com sangue pode afetar a eficácia reprodutiva, facilitando a previsão de problemas relacionados ao uso desse material, aperfeiçoamento do manejo em cativeiro e auxiliando na tomada de decisões.

**CAPÍTULO 2- Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Aquaculture.**

## REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF *Rhamdia quelen* MILT CONTAMINATED WITH BLOOD

Raquel S. Santos<sup>1</sup>, Danilo P. Streit Jr<sup>1</sup>

Animal Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author: Email: danilo.streit@ufrgs.br; Av. Bento Gonçalves 7712 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, BR 90040-060

### 1. INTRODUCTION

The management and domestication of native species still face many obstacles related mainly to reproduction in captivity, as different species require specific conditions to reproduce (Ciereszko et al., 2004; Andrade and Yasui, 2003). Artificial reproduction of fish is a routine activity, both in research laboratories and in the commercial production sector, it is facilitated by hormonal induction, which consists of the administration of hormones that stimulate final maturation and spermiation /ovulation of fish (Mylonas et al., 2017). Different methods can be used to collect fish milt, depending on testis morphology, and intended use. The most applied technique is abdominal massage, or stripping, which helps the milt to be released from the gonad to the spermatic duct, through an abdominal massage (Beirão et al., 2019). During stripping, contamination of milt with blood is common (Marques et al., 2021; Ciereszko et al., 2004).

The presence of blood cells in fish milt is related to the lack of standardization in the technique of collecting different species (Carolsfeld et al., 2003), inflammation in the fish reproductive tract (Własow et al., 1999), and possible physiological factors in the milt (Ciereszko et al., 2004). The volume of milt produced by the species can also be a determining factor for contamination during collection. Species such as *Rhamdia quelen* and *Brycon orbignyanus*, for example, release a considerable volume of milt (> 5 mL) in the extrusion (Da Costa et al., 2019; Palhares et al., 2021), while others, such as *Leporinus macrocephalus* and *Zungaro jahu*, have such a low volume (< 0,7 mL) that the animals' testes must be extracted (Viveiros and Godinho, 2009; Machado et al., 2008), so that milt quality is not compromised by contamination. This scenario tends to get worse, if species are threatened with extinction, and they represent many in the same condition (Palacios-Abrantes et al., 2020; Machado et al., 2008).

It is proven in the literature that seminal plasma and blood plasma have the same osmolarity, for this reason, blood is not able to activate seminal motility (Marques et al., 2021). In fish studies, the authors reported that presence of blood decreased motility and fertilization rates (Bobe and Labbé, 2008), and decreased the quality of only for samples cryopreserved (Marques et al., 2021). However, Ciereszko et al. (2004) showed that contamination with blood did not influence the milt motility of *Oncorhynchus mykiss*. However, there are few studies that have evaluated the influence of milt contamination with blood on fertilization and hatching rates of fish, and there is no support for the use or not of this material, the sample being discarded, producing economic losses, in addition to biological ones.

The silver catfish (*R. quelen*), in addition to being an species in the commercial sector, has easy handling and well-established artificial reproduction in captivity, thus being used in extensive studies, such as: control and prevention of pathogens in fish (Negrelli et al., 2019;) improvement of aspects aimed at the reproduction of fish in captivity (Rodrigues et al., 2020; Hilbig et al., 2019), hematological parameters in fish (Barcellos et al., 2004), improvement of aspects nutritional (Bombardelli et al., 2020), toxicology conservation of gametes from Neotropical species (Goes et al., 2017), and anesthetic procedures (Teixeira et al., 2021), among others. The use of this animal to obtain answers about the influence of milt contamination with blood will help to understand the implications of this contamination on the reproductive quality of the species, also subsidizing aspects of captive production and contributing to native species at risk.

In this context, considering that the quality of fish spermatozoa is a fundamental condition for good fertilization and, consequently, the perpetuation of the species (Alavi and Cosson, 2006 Dadras et al., 2019), the objective of our study is to evaluate the efficiency of the reproduction of fresh milt of *R. quelen* contaminated with 5 and 10% blood.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Ethics statement**

All experimental procedures included in this study were approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA, UFRGS) (protocol number 23962), and performed according to the regulations and guidelines established by National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), at the Laboratory for



the Production and Conservation of Biodiversity of Aquatic Species (AQUAM), in the city of Porto Alegre, southern Brazil, (30° 04'24" S; 51° 08'11" W).

#### Origin of breeders and gametes collection

The fish group consisted of 20 males (11 months, 350 ± 027 g) and 4 females (2 years, 640 ± 029 g) of South American silver catfish (*R. quelen*) acquired from a commercial fish farm. The animals were separated by sex and four weeks before the experiment, they were acclimatized in a continuous water recirculation system, at 24 ± 09 °C temperature, 7.0 ± 0.5 pH, and 5 ± 0.5 dissolved oxygen. This fish was fed twice a day (8:00 am and 4:00 pm) with a commercial diet (32% crude protein, Acqua Fish, Supra®, Alisul, Brazil) until apparent satiety. Feeding was suspended for 24 hours to collect milt samples. Males with detectable running milt under soft abdominal pressure, and females with bulging of the celomathic cavity and reddish urogenital papilla were selected for hormonal induction (Baldisseroto and Radünz-Neto, 2004; Bombardelli et al., 2006).

Hormonal induction was performed with Carp Pituitary Extract (CPE) via intramuscular application. Males received a single dose of 3 mg/kg (CPE/fish body weight) (Sanches et al., 2011a). Females were induced with two hormonal doses of CPE: the first dose at a concentration of 0.5 mg/kg performed 12 h before the second dose at a concentration of 5 mg/kg (Bombardelli et al., 2006). Gamete collection was performed after a period of 240 degrees-hour (10 h; water at 24 °C), monitored from the second hormonal application. For this, the urogenital papilla of fish was previously cleaned, and dried, with a paper towel, and then abdominal massage was performed in the cephalocaudal direction.

From each male, 2 mL of milt were collected from the test tube, kept at 15°C in styrofoam boxes (Sanches et al., 2011b), until the end of the collection in all animals, prior evaluation of the samples to form the pool. The first aliquot of milt from each animal was discarded to avoid contamination with water, urine, or feces (Marques et al., 2021). In females, the collection was like males, and a spawning was selected based on the characteristics of uniformity of size, color, and absence of blood in the mass of released oocytes (Adames et al., 2015). The experimental water parameters are 24± 0.1 °C temperature, 7.2 ± 0.1 pH, 0 mg/L nitrite, 0 mg/L ammonia and 5 ± 0.5 dissolved oxygen.

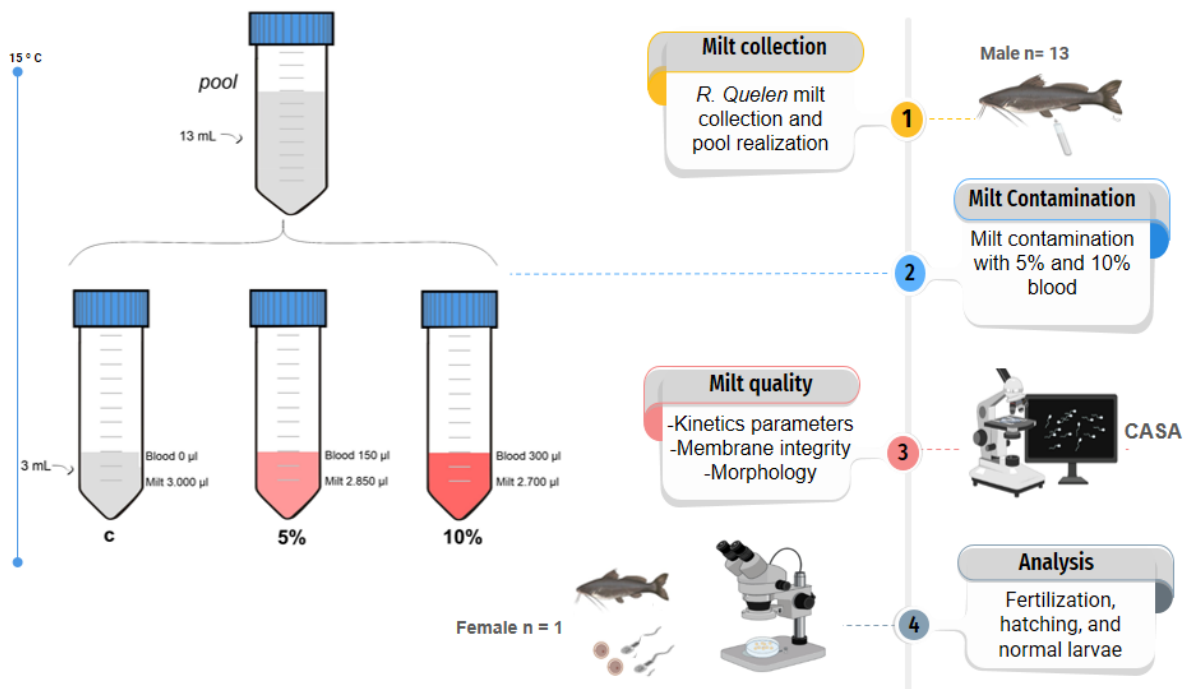
## 2.2 Initial milt assessment and pool preparation

To assess the milt motility of the sample from each animal, 1  $\mu\text{L}$  of milt was activated with 5 mL of distilled water, and analyzed under an optical microscope (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan), in a 40X objective. Motility was expressed as the percentage of motile spermatozoa in relation to the total amount.

The milt pool from 13 males ( $378 \pm 02$  g) was mixed and homogenized to form a 1 mL pool of each animal with a minimum initial prior motility of 80% (Da Costa et al., 2019), also discarding samples with activated milt in the collection, in this screening, samples from 7 animals were excluded.

## 2.3 Experimental design

The treatments consisted of two levels of contamination with blood, 5% and 10%, and a group without contamination, this being the control group. A milt pool was used to isolate the male effect; treatments were contaminated with blood collected from a single male chosen at random. The fertilization assay was performed using single female spawning to isolate the female effect. The samples were analyzed by testing milt kinetic parameters, spermatozoa morphology, plasma membrane integrity, fertilization, hatching and normal larvae (Fig.1).



**Figure 4.** Experimental design to evaluate the productivity rates of Jundiá (*R. quelen*) milt, contaminated with experimental treatments: C= control, no blood; 5%= contaminated with 5% blood; 10%= contaminated with 10% blood.

## **2.4 Blood collection and sample contamination**

A volume of 3 mL of blood was obtained by caudal venipuncture in a randomly chosen male sire, with the aid of a syringe (5 mL) with an attached needle. Anesthetics and anticoagulants were not used in this management, to avoid possible hematological changes that could compromise the results of milt contamination, as reported by De Paiva et al., (2013). With the precision manual pipette (100-1000 $\mu$ L HTL Labmate Pipette), the blood was pipetted directly from the collection syringe, and distributed over the milt pool in two groups (Fig. 1). These samples were also kept in Styrofoam boxes (15 °C), and the milt assessments were completed within 3 hours after the contact of the milt with the blood.

## **2.5 Milt assessments**

### **2.5.1 Concentration sperm**

For sperm concentration and morphology, male samples were fixed in 10% buffered formaldehyde solution at a 1:1000 dilution (1  $\mu$ L milt: 999  $\mu$ L formaldehyde solution). The evaluation of milt concentration was performed following the protocol of Sanches et al., (2011b): an aliquot (10  $\mu$ L) of the fixed milt was pipetted into each counting field of the Neubauer chamber and covered by a coverslip for 15 min to stabilize the cells. Using a microscope at 400x magnification (Bel Solaris, Milan, Italy) and a portable counter, milt was quantified by counting 10 squares. After counting, sperm concentration was calculated by the following equation: Number of cells (millions/mL) = average number of cells counted in the Neubauer chamber x 250,000 x dilution factor.

### **2.5.2 Kinetics parameters (CASA)**

For the evaluation of kinetic parameters, 1 $\mu$ L of sperm was activated by 1000 $\mu$ L of distilled water, then 1  $\mu$ L of the activated sample was placed in a Neubauer chamber (Olen, Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil), covered with a coverslip and observed under a microscope (Bel Solaris, Milan, Italy), at 100 $\times$  magnification, with an attached digital video camera (Basler AC640-120uc, 658 $\times$ 492 pixels, 120 fps, Ahrensburg, Germany).

Image capture started 10 s after activation, at a rate of 50 frames per second (fps), using the Pylon Viewer program (Version 4.1.0.3660 64-Bit; Basler, Ahrensburg, Germany), and seven replicates were made for each treatment. After filming the cell movement, the videos

were then separated into 50 images using VirtualDub 200 software (Version 1.10.04; Microsoft Virtual Studio, Redmond, USA), which represent 0.5 s of the video (adapted from Adames et al., 2015). The images were analyzed using the Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) free plugin software from ImageJ (Version 1.53e 64-Bit, National Institutes of Health, USA) (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007). The parameters evaluated were motility rate (MOT, %), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), Straightness (STR, %), wobble (WOB, %), progression (PROG,  $\mu\text{m s}^{-1}$ ), and beat cross frequency (BCF, Hz). The following input variable values were used in the CASA plugin: a=1 b=60 c=50 d=10 e=5 f=10 g=20 h=5 i=1 j=15 k=10 l=20 m=80.000000000 n=80.000000000 o=50.000000000 p=60.000000000 q=100 r=477.2222 s=0 t, =0 (adapted by Neumann et al., 2019).

### **2.5.3 Morphology spermatozoa**

The evaluation of spermatozoa morphology was performed following the protocol of Streit Jr. et al., (2004): the fixed samples were diluted in Bengal Rose dye (4%) (Merck, 148 Darmstadt, Germany) at a 1:10 dilution in a plastic tube (1.5 mL). Smears of 20  $\mu\text{L}$  of stained milt were evaluated under an optical microscope at 1000x magnification (Nikon E200, Tokyo, 150 Japan). Spermatozoa (n=200) were evaluated from each sample, and the number of normal and abnormal cells was expressed as a percentage (Da Costa et al., 2019). The following morphological changes were evaluated: broken tail, curled tail, strongly curled tail, distally curled tail, short tail, distal and proximal gout, loose head, degenerated head, microcephaly and macrocephaly (Da Costa et al., 2019).

### **2.5.4 Plasma Membrane Integrity**

To assess the integrity of the milt membrane, the protocol adapted from Blom (1950) was used, using the dyes Eosin-Y at 3% and Nigrosin at 5% (both Sigma-Aldrich). 10 $\mu\text{L}$  of milt was pipetted into 30 $\mu\text{L}$  of each dye in a 2 mL plastic tube for homogenization, then 20 $\mu\text{L}$  of this sample was pipetted onto a glass slide. Seven slides were made per treatment. After drying the slides in air, they were analyzed under an optical microscope (Bel Solaris, Milan, Italy) at 400x magnification. The spermatozoa (n=200) that presented the stained head were interpreted as having the membrane compromised, since the rupture of the membrane allows

the entry of the dye substance, and the number of intact and non-integrated cells was expressed as a percentage.

### 2.5.5 Fertilization, hatching, and normal larvae

To obtain fertilization rates, gametes from a female (702 g of body weight, 195 g of spawning weight) were used, collected as described above, using the proportion of 70,000 motile sperm per oocyte, following the protocol of Neumann et al. (2019). For this, samples of 0.1 mL of spawning ( $178 \pm 3.1$  oocytes) were placed in 50 mL plastic cups (seven repetitions were performed for each treatment), and the milt dosage was added to these oocytes. Then, they were activated with the addition of 10 mL of distilled water and homogenization for 60 s. The samples were then transferred to small circular sieves (5.5 x 3 cm) of nylon nets distributed in 3 units randomly in incubators (5 L), where they were incubated at  $24 \pm 0.5$  °C, with water recirculation,  $7.2 \pm 0.2$  pH and  $4.9 \pm 0.5$  mg/L of dissolved oxygen. The measurement of the rates of fertilization was performed after the closing of the embryonic blastopore, approximately 12 h after fertilization at 24 °C (Pereira et al., 2006), by counting all embryos from each experimental unit (sieve) using a binocular stereoscope (Q7740SZ-T, Quimis, Diadema) with the aid of an adapted glass plate and manual counter. To obtain the fertilization percentage, the following equation was used:

$$\% \text{ fertilization} = \text{viable embryos} \div \text{total oocyte fertilized} \times 100$$

Hatching occurred about 33 hours (24°C) after fertilization. The ratio of hatched larvae was evaluated by counting the larvae that ruptured the chorion, and the percentage was obtained by the following equation:

$$\% \text{ hatched} = \text{hatched larvae} \div \text{total oocyte fertilized} \times 100$$

The larval morphological evaluation was accessed simultaneously with the evaluation of the larvae hatching rate. Normal larvae were those without any abnormalities in the spine, yolk sac or head (Jeziarska et al., 2009). To obtain the percentage of hatched larvae with normal morphology, the following equation was used:

$$\% \text{ normal larvae} = \text{normal larvae} \div \text{total hatched larvae} \times 100$$

### 2.6 Statistical analysis

All data were submitted to homogeneity analysis (Levene's test) and normality tests (Shapiro Wilk or Kolmogorov Smirnov). Normalization of data in logarithm was performed when necessary. Subsequently, ANOVA was applied in the groups and when a significant difference was observed, we applied the Tukey's test. For the non-parametric data, we used Kruskal Wallis analysis and Dunn's test when a significant difference was observed between treatments. All tests were performed considering a significance of 5%. Data are presented as

mean and standard deviation. The statistical analysis and making of the graphics were performed with the aid of the Graphpad Prism 7.0 software.

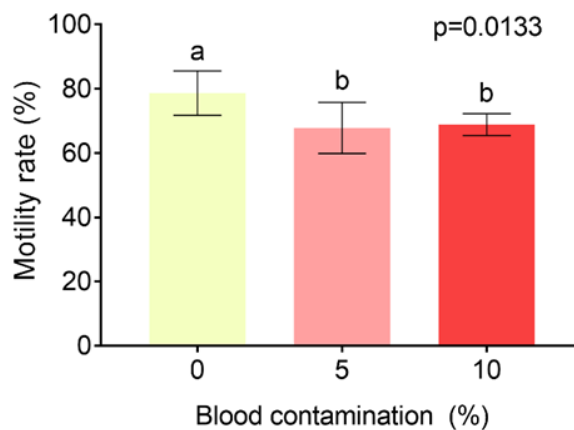
### 3. RESULTS

#### 3.1 Aspects of the samples and Concentration milt

The amount of blood contamination in an ejaculate can be difficult to estimate based on the gross color change. The milt samples with 5% were pink, and 10% of the blood showed pink tending to red. The sample volume of each treatment was 3 mL, with milt concentration of  $1.96 \times 10^{11}$ ,  $1.86 \times 10^{11}$  and  $1.76 \times 10^{11}$  milt/mL, in the control treatment, 5% and 10%, respectively.

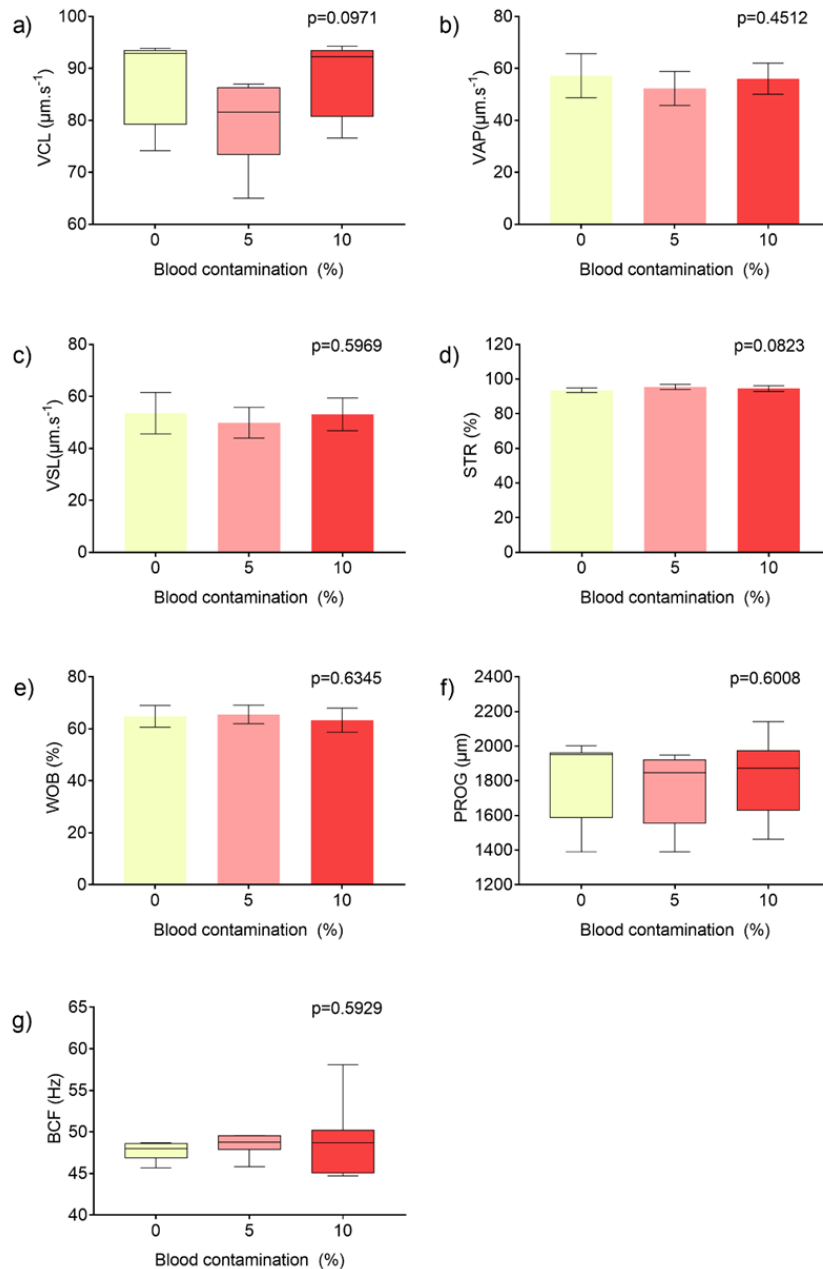
#### 3.2 Kinetics parameters milt (CASA)

The milt motility observed in the control group ( $78.64 \pm 6.90\%$ ) was higher ( $p=0.0133$ ) when compared to the groups with 5% contamination ( $67.83 \pm 7.95$ ) and 10% blood ( $68.87 \pm 3.40\%$ ) (Figure 2).



**Figure 5.** Percentage of motile cells in Jundiá (*R. quelen*) milt, contaminated with 5% and 10% blood. Values of  $p < 0.05$  indicate a significant difference between the experimental groups by analysis of variance. Different letters indicate a significant difference between the experimental groups by the Tukey test.

The kinetic parameters VCL, VAP, VSL, STR, WOB, PROG and BCF of silver catfish sperm did not differ ( $p > 0.05$ ) between the experimental groups. Seminal contamination with 5 or 10% of blood did not affect, in relation to the control group (as can be seen in Figure 3a, b, c, d, e, f, g).

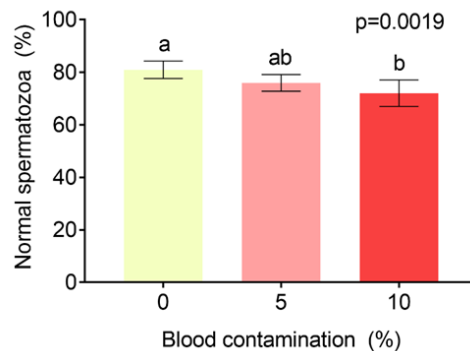


**Figure 6.** Kinetic parameters of fresh milt Jundiá (*R. quelen*) contaminated with 5% and 10% blood assessed by CASA: a) Velocities curvilinear (VCL), b) average path (VAP), c) straight-line (VSL), d) straightness (STR), e) wobble (WOB), f) Progression, g) and Beat Cross Frequency (BCF). The variables VCL ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ), PROG ( $\mu\text{m}/\text{s}$ ) and BCF (Hz) were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis

analysis. The variables VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL ( $\mu\text{m/s}$ ), STR (%) and WOB (%) were variables by one-way analysis (One-Way ANOVA).

### 3.3 Morphology spermatozoa

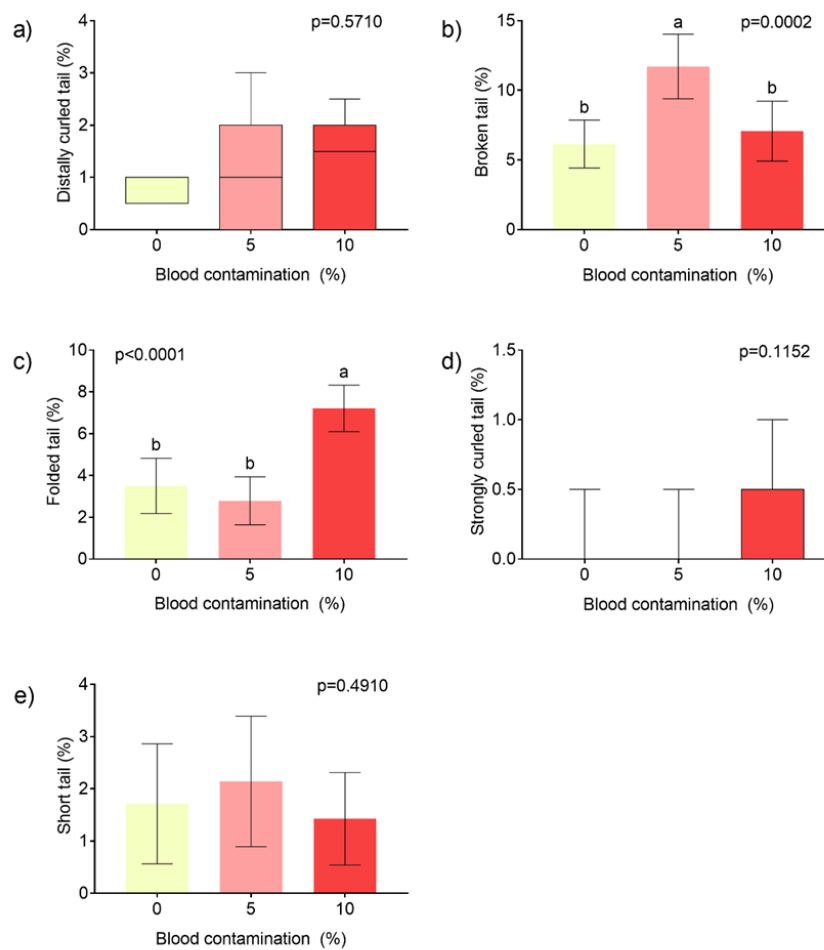
The percentage of normal sperm was higher ( $p=0.0019$ ) in the control group ( $81\pm 3.32\%$ ) when compared to the group with 10% blood contamination in the milt ( $72.07\pm 5.04\%$ ), while the group with 5% blood contamination did not differ from the others and had  $76\pm 3.19\%$  of normal sperm (Figure 4).



**Figure 7.** Percentage of normal spermatozoa of Jundiá (*R. quelen*) contaminated with 5% and 10% blood assessed by by Rose Bengal (4%) stain, and observed and counted using an optical microscope ( $1000\times$  magnification) and manual counter, respectively. Values of  $p<0.05$  indicate a significant difference between the experimental groups by analysis of variance. Different letters indicate a significant difference between the experimental groups by the Tukey test.

Spermatozoa tail abnormalities were present, where the percentage of sperm with broken tail was higher ( $p=0.0002$ ) in milt contaminated with 5% blood ( $11.71\pm 2.33\%$ ) compared to the control ( $6.14\pm 1.73\%$ ) and contaminated with 10% of blood ( $7.07\pm 2.15\%$ ) (Figure 5b). The percentage of bent-tailed sperm was higher ( $p<0.0001$ ) in the milt contaminated with 10% blood ( $7.21\pm 1.11\%$ ) than in the control ( $3.5\pm 1.32\%$ ) and in the milt contaminated with 5% blood ( $2.79\pm 1.15\%$ ) (Figure 5c). There was no difference between the experimental groups for distally curled tail ( $p=0.5710$ ), strongly curled tail ( $p=0.1152$ ) and short tail ( $p=0.4910$ ) abnormalities (Figures 5a, d, e).

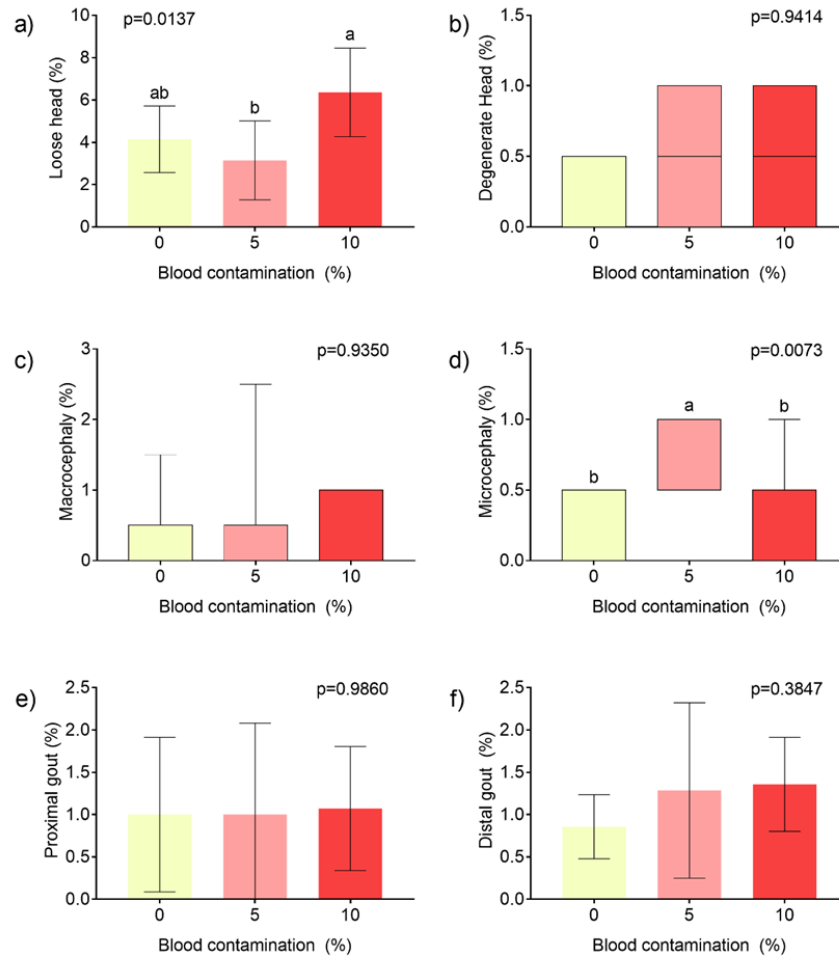




**Figure 8.** Morphology of fresh spermatozoa Jundiá (*R. quelen*) contaminated with 5% and 10% blood analyzed by Rose Bengal (4%) stain, and observed and counted using an optical microscope (1000  $\times$  magnification) and manual counter, respectively. Tail milt (or flagellum) abnormalities: The distally curled tail (%) and strongly curled tail (%) variables were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis analysis. Broken tail (%), bent tail (%) and short tail (%) variables were analyzed by one-way analysis of variance (One-Way ANOVA). Different letters indicate differences by Tukey's test.

Abnormalities of the spermatozoa head and cytoplasmic gouts can be seen in Figure 6. There was a difference between the experimental groups for the percentage of milt with loose head ( $p=0.0137$ ) and with microcephaly ( $p=0.0073$ ). The group contaminated with 10% of blood had the highest percentage of spermatozoa with loose head ( $6.36\pm 2.09$ ), differing from the group contaminated with 5% of blood ( $3.14\pm 1.86\%$ ), and not differing of the control group ( $4.14\pm 1.57\%$ ) (Fig. 6a). The percentage of spermatozoa with microcephaly was higher in the group with 5% blood contamination ( $0.43\pm 0.93\%$ ) compared to the control group ( $0.36\pm 0.56\%$ ) and 10% blood contamination ( $0.36\pm 0.48\%$ ) (Fig. 6d). There was no difference between the experimental groups for abnormalities of degenerated head ( $p=0.9414$ ), macrocephaly

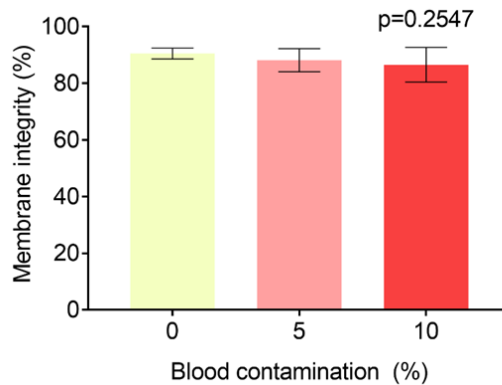
( $p=0.9350$ ), proximal cytoplasmic gout ( $p=0.9860$ ) and distal cytoplasmic gout ( $p=0.3847$ ) (Fig. 6b, c, e, f).



**Figure 9.** Morphology of fresh spermatozoa Jundiá (*R. quelen*) contaminated with 5% and 10% blood analyzed by Rose Bengal (4%) stain, and observed and counted using an optical microscope (1000 × magnification) and manual counter, respectively. Spermatozoa head and cytoplasmic gout abnormalities: The variables degenerate head (%), macrocephaly (%) and microcephaly (%) were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis analysis. The variables loose head (%), proximal gout (%) and distal gout (%) were analyzed by one-way analysis of variance (One-Way ANOVA). Different letters indicate difference by Tukey's test (Loose head) and by Dunn's test (microcephaly).

### 3.4 Plasma Membrane Integrity

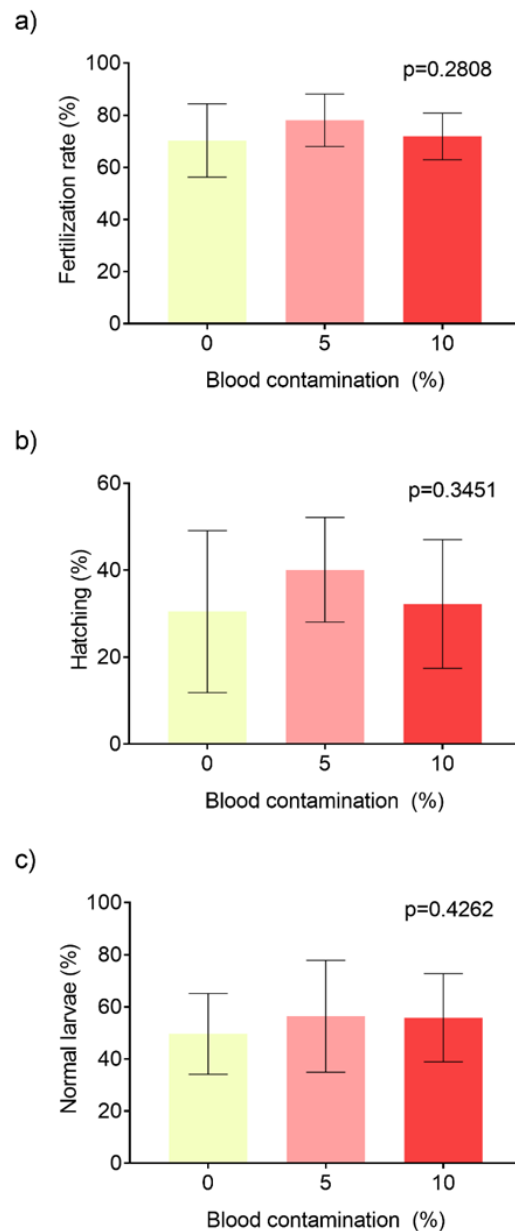
There was no difference ( $p=0.2547$ ) between the experimental groups for membrane integrity, and the values obtained for the control group, with 5% and 10% blood contamination were  $90.5\pm 1.92\%$ ,  $88.14\pm 4.06\%$  and  $86.5\pm 6.11\%$ , respectively (Figure 7).



**Figura 10.** Sperm membrane integrity of fresh Jundiá spermatozoa (*R. quelen*) contaminated with 5% and 10% of blood analyzed by the nigrosin staining method –eosin and light microscope (400x). Spermatozoa with white staining had an intact membrane, and those with red or pink staining had no integrity. Values of  $p < 0.05$  indicate a significant difference between the experimental groups by analysis of variance. Different letters indicate a significant difference between the experimental groups by the Tukey test.

### 3.5 Fertilization, hatching, and normal larvae

There was no difference in the fertilization rate ( $p=0.2808$ ) between the experimental groups, whose observed values were  $70.31\pm 14.06\%$ ,  $78.06\pm 10.07\%$  and  $71.87\pm 8.95\%$  for the control groups, contaminated with 5% and 10% of blood, respectively (Figure 8a). There was no difference in the hatching rate ( $p=0.3451$ ) between the experimental groups, whose observed values were  $30.49\pm 18.62\%$ ,  $40.11\pm 12.06\%$  and  $32.24\pm 14.81\%$  for the control groups, contaminated with 5% and 10% blood, respectively (Figure 8b). There was no difference in the percentage of larvae with normal morphology ( $p=0.4262$ ) between the experimental groups, whose observed values were  $49.64\pm 15.52\%$ ,  $56.41\pm 21.47\%$  and  $55.81\pm 16.95\%$  for the control groups, contaminated with 5% and 10% blood, respectively (Figure 8c).



**Figure 11.** Productivity indices of silver catfish Jundiá (*R. quelen*) using milt with different levels of contamination with blood (0, 5 and 10%). Rates of a) Fertilization, b) Hatching, c) Normal larvae; the results were obtained after counting and evaluating all eggs and larvae collected in sieves. There was no difference between the experimental groups by one-way analysis of variance (one-way ANOVA).

#### 4. DISCUSSION

In this study, it was possible to verify that fresh milt contaminated with up to 10% of blood did not produce a loss in the reproductive efficiency of *R. quelen*. This finding contributes to the reproductive protocol of the species based on the conscious use of the breeders, as

sometimes a significant volume of milt is discarded without the real need, generating economic losses.

Milt motility has been the main indicator of the reproductive efficiency of fish species (Billard and Cosson, 1992). In our methodology, we isolated three factors from Taborsky's (1998) premise, four preponderant for successful fertilization: 1) proximity of the male to the female at the time of gamete preparation; 2) synchronization of males and females in the release of gametes; 3) minimal sperm to oocyte ratio. In this case, as the reproduction was carried out in the laboratory, factors 1 and 2 are not considered, while for factor 3, we use the minimum ratio of 1:70,000 (oocyte:spermatozoa) established by Neumann et al., (2019) for *R. quelen*. Thus, the influences on productivity rates can only be associated with the fourth factor mentioned by Taborsky (1998), which refers to the kinetic characteristics of milt, such as percentage of motile cells, and movement patterns.

In the present study, the percentage of motile cells was lower in the groups contaminated with 5 and 10% of blood (67% and 68%, respectively) compared to the control group (78%), however, the milt motility patterns were not different between the experimental groups, and rates of fertilization, hatching and normal larvae, were not affected. The percentage loss in sperm motility of *R. quelen* semen samples contaminated with blood, in relation to uncontaminated milt, was expected and, in fact, occurred, albeit in small proportions. In a recent study carried by Marques et al. (2021), assessing fresh tambaqui milt contaminated with 10% of blood, the authors observed 79% of mobile cells, also lower percentage when compared to 95% at control. In the literature, we did not find a minimum reference of motility cells that could be directly correlated with the fertilization rate for a Neotropical South American species, as in *Oncorhynchus mykiss*. In this species, Liley et al. (2002) defined a minimum motility rate of 76% of motile cells, so that there is no influence on the fertilization rate.

Some authors emphasize the importance of spermatozoa motility for a good fertilization rate (Ribeiro and Godinho, 2003; Rurangwa, 1998; Rana, 1995). However, they also argue that more detailed validation can elucidate the relationship of motility to successful fertilization, as spermatozoa, although motile, may not be viable (Ribeiro and Godinho, 2003). Furthermore, these two parameters can be affected by experimental subjective personal observation (Boryshpolets et al., 2013).

In recent years, researchers have used the CASA system to analyze motility patterns such as VAP, VCL, VSL and other indicators (Jia et al. 2022), and based on this methodology, they point out that the fertilization process seems to occur at the moment of higher average velocity of the sperm path. (Burness et al., 2004; Gage et al., 2004; Gallego et al., 2013;

Neumann et al., 2019). In *R. quelen*, it was highlighted that the highest average path velocity (VAP) was observed 11 s after activation, coinciding with a higher fertilization rate for that moment compared to 16 s and 30 s after sperm activation (Neumann et al., 2019). These studies are in agreement with the findings of our research, because even with a lower percentage of mobile cells in the contaminated treatments (5% and 10% of blood), the motility patterns remained adequate (equal to the control group) and the fertilization capacity of the contaminated treatments was not inferior to the control group. It is important to note that motility was verified 10s after activation in all treatments, a standard time adopted to avoid an erroneous reading when analyzed immediately or later.

The percentage of cells with normal morphology in the contaminated groups of the present study is similar to that already reported for the semen of *R. quelen* (Da Costa et al., 2019; Neumann et al., 2019; Bombardelli et al., 2006). However, four pathologies stood out in the contaminated treatments, being two pathologies of the tail and two of the head, causing the milt with 10% of blood to be inferior to the control in this evaluation. The means of the two tail abnormalities (broken and bent tail) in samples contaminated with blood were similar: 14.5 and 14.28%, and 5 and 10%, respectively. For head abnormalities (loose head and microcephaly), the group with 5% blood had 3.57%, and the group with 10% blood had almost twice as much (6.72%). This seems to be the reason why only milt contaminated with 10% blood differed from the control group, and milt contaminated with 5% blood did not differ from the two groups (control and 10%).

As for the sperm abnormalities observed in the control group of the present study (19%), these were very similar to the averages of fresh milt of the same species, observed by Da Costa et al. (2019), except for the loose head abnormality. This comparison allows us to infer that, in fact, the four abnormalities that stood out in the contaminated treatments in our study are related to the presence of blood in these samples, except for the microcephaly abnormality, whose highest percentage recorded in our study was 0.43% in the milt with 5% blood, much lower than the 1.13% observed by these researchers. Although not clarified for fish, in mammals, sperm with microcephaly are considered immature sperm (Ax et al., 2004).

The hypotheses to explain the increase in abnormalities in contaminated treatments are not definitive, but the lower percentage of mobile cells compared to control milt may have occurred due to the greater involvement of the flagellum in these two groups. Researchers have tried to explain how the presence of blood can influence seminal quality and, in this scenario, there are two main lines of discussion: one points to the red blood series (Rijselaere et al., 2004; Voss et al., 1976), while the other another points to white blood cells (Eley et al., 2005;

Aziz et al. 2004; Zalata et al., 1998; Plant et al. 1994). However, both the potentially toxic iron released by hemoglobin and the production of ROS (Reactive Oxygen Species) from the excessive presence of granulocytes may contribute to increased levels of oxidative stress (Bobe and Labbé, 2008) due to the presence of abundance of acidic fats in the sperm membrane, causing damage to this membrane (Rijisselarae et al., 2004), and aging in sperm cells, resulting in decreased membrane fluidity and affecting motility (Zalata et al., 1998), aspects strongly associated with sperm pathologies (Marques et al., 2021; Aziz et al. 2004; Rijisselarae et al., 2004; Zalata et al., 1998; Voss et al., 1976).

Weakness in the midpiece was attributed by Barth and Oko (1989) as the origin of the loose head abnormality in the sperm. In this case, the excessive presence of ROS in the contaminated samples may have weakened the sperm intermediate piece, causing it to detach from the tail when initiating motility. This assumption can still be supported by Aziz et al. (2004) who found a positive correlation between increased concentration of blood cells with defects in the sperm midpiece. In this context, the abnormalities that stood out the most in our study seem, in fact, to have occurred because of oxidative stress caused by cells present in the blood, such as hemoglobin and leukocytes. However, the general quality of *R. quelen* milt contaminated with 5 and 10% blood was high, with no negative influence on fertilization, hatching and larval morphology.

The integrity of the plasma membrane and its selective permeability are essential for sperm survival. The membrane integrates, acts in the oocyte-sperm interaction and maintains the osmotic balance, enabling the physiological functionality of the cell (Díaz et al., 2021; Figueroa et al., 2016; Kubota et al., 1995). The impairment of membrane channels directly affects the morphological structure and motility of sperm, as cell movement depends on aspects such as the physiological state of mitochondria, ATP production and flagellum functionality (Figueroa et al., 2016). In the present study, the contaminated treatments showed high levels of membrane integrity (90, 88 and 86% for control, 5 and 10%, respectively), and of cells with normal morphology (81, 76 and 72%, for control, 5 and 10%, respectively). Although sperm with membranes or even fragmented DNA still can fertilize, the quality of the offspring tends to be severely impaired (Figueroa et al., 2016; Labbé et al., 2001; Kubota et al., 1995).

In the thawed semen of *Colossoma macropomum* contaminated with 10% of blood, there was a loss of 16% of motility, however, there was no difference in the control regarding membrane integrity (Marques et al., 2021). These results corroborate our findings, whose contaminated treatments had a loss of 13 and 12% in motility for 5 and 10% of blood, respectively, and there was also no difference in membrane integrity rates between the groups.

In this context, we can infer that the high rates of membrane integrity, which support the normal functionality of sperm cells (Figueroa et al., 2016), were decisive for the maintenance of sperm morphological structure, resulting in adequate sperm movement capacity (Neumann et al., 2019), not causing a drop in semen productivity aspects of *R. quelen*.

Our results can be corroborated by the short storage period of the contaminated samples and the low concentrations of contamination investigated, since the higher the concentration of blood in the semen, the greater the drop-in productivity rates (Turner et al., 2016). The time of exposure of semen to blood is also a determining factor, periods of longer storage of this contaminated material have a proportional relationship with the decrease in seminal quality (Rijsselaere et al., 2004). Furthermore, we suggest that semen from an animal with an inflamed reproductive tract will eventually have a higher concentration of leukocytes, compared to semen from an animal that sheds blood during collection without prior inflammation, which can exacerbate oxidative stress.

In conclusion, fresh milt of *R. quelen* contaminated with up to 10% of blood does not influence the reproductive quality of the species, reflecting adequate rates of fertilization, hatching and larval morphology. We also suggest that the period of storage of milt after contact with blood should be considered before its use for fertilization.

### **Acknowledgements**

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Competing interests statement**

The authors declare no competing interests.

### **Funding sources**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors



## REFERENCES

- Adames, M.S., de Toledo, C.P.R., Neumann, G., Buzzi, A.H., Buratto, C.N., Piana, P.A., Bombardelli, R.A., 2015. Optimization of the sperm: Oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science*. 161, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: areview. *Cell biology international*, 30(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004>
- Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellin, M.E., 2004. Avaliação do sêmen. In: E.S.E. Hafez (ed.). *Reprodução Animal*. Manole Ed. São Paulo, Brazil, pp 369-380.
- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr., 2004. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertility and Sterility*, 82(3), 621-627. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.112>
- Baldisseroto, B., 2004. Biologia do jundiá. In: Baldisseroto, B.; Radünz Neto, J. (Eds.). *Criação de jundiá*. Santa Maria: Editora UFSM. p.67-72.
- Barcellos, G., Carlos, L., Souza, C. De, Beatriz, L., Fioreze, I., Mezzalira, R., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.D.A., Terra, S., 2004. Hematological changes in jundia, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard Pimelodidae), after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.026>
- Barth, A.D.; Oko, R.J., 1989. Normal bovine spermatogenesis and sperm maturation. In: Barth, A.D. and Oko, R.J. (Eds.). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, p.19-88.
- Beirão, J., Boulais, M., Gallego, V., O'Brien, J. K., Peixoto, S., Robeck, T. R., & Cabrita, E., 2019. Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology*, 133, 161-178. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.004>
- Bobe, J., Labbé, C., 2008. -Chilled storage of sperm and eggs. In *Methods in Reproductive Aquaculture* (pp. 241-258). <https://doi.org/10.1201/9780849380549>
- Bombardelli, R.A., de Oliveira, E.J., Syperreck, M.A., Pedreira, A.C. de O., de Freitas, J.M.A., Marques, A.E.M.L., Cestari, M.M., Meurer, F., 2020. Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. *Aquaculture* 530, 735724. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735724>
- Bombardelli, R. A., Mörschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A., Syperreck, M. A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2006, v. 35, n 4. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500001>

- Billard, R., Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. *J. Exp. Zool*, v.261, p.122-131 <https://doi.org/10.1002/jez.1402610203>.
- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertil Steril* 1(2):176–177.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R.K., Dietrich, G.J., Dzyuba, B., Ciereszko, A., 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 80 (7), pp. 1 8, 10.1016/j.theriogenology.2013.06.019
- Burness, G., Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I., Moyes, C. D., Montgomerie, R., 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56(1), 65-70. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0752-7>
- Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni Filho, E., Harvey, B.J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* 63, 472–489. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>
- Ciereszko, A., Własow, T., Dobosz, S., Goryczko, K., Glogowski, J., 2004. Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. *Theriogenology*, 62(7), 1353-1364. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.003>
- CONCEA, 2019. Anexo Resolução Normativa nº 44, de 1º de agosto de 2019 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. “Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica – II”. [https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Anexo-RN-Peixes-ii.pdf](https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-RN-Peixes-ii.pdf)
- Da Costa, B.B., Marques, L.S., Lassen, P.G., Rodrigues, R.B., Streit, D.P., 2019. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Applied Ichthyology* 35, 987–993. <https://doi.org/10.1111/jai.13928>
- Dadras, H., Boryshpolets, S., Golpour, A., Policar, T., Blecha, M., Dzyuba, B., 2019. Effects of temperature on sperm motility of burbot *Lota lota*: spontaneous activation and calcium dependency. *Journal of fish biology*, 95(4), 1137-1144. 10.1111/jfb.14110
- De Paiva, M. J. T. R., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., Egami, M. I., 2013. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Díaz, R., Quinones, J., Short, S., Contreras, P., Ulloa-Rodriguez, P., Cancino-Baier, D., Farias, J. G., 2021. Effect of exogenous lipids on cryotolerance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) spermatozoa. *Cryobiology*, 98, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.004>
- Eley, A., Hosseinzadeh, S., Hakimi, H., Geary, I., Pacey, A. A., 2005. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Human reproduction*, 20(9), 2601-2607. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei082>

- Figuroa, E., Valdebenito, I., Merino, O., Ubilla, A., Risopatrón, J., & Farias, J. G. (2016). Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *Journal of Fish Biology*, 89(3), 1537-1550. <https://doi.org/10.1111/jfb.13052>
- Hilbig, C.C., do Nascimento, N.F., Heinen, A.L., Neto, A.T., Funghetto, J.P., Bombardelli, R.A., Meurer, F., Okada Nakaghi, L.S., 2019. Effects of dietary fatty acids on the reproduction of South American female catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 47, 456–466. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-8>
- Gage, M. J., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B., & Parker, G. A., 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current biology*, 14(1), 44-47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.028>
- Gallego, V., Carneiro, P. C. F., Mazzeo, I., Vílchez, M. C., Peñaranda, D. S., Soler, C., Asturiano, J. F., 2013. Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology*, 79(7), 1034-1040. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.019>
- Goes, M.D., Reis Goes, E.S. dos, Ribeiro, R.P., Lopera-Barrero, N.M., Castro, P.L. de, Bignotto, T.S., Bombardelli, R.A., 2017. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: Reproductive parameters and genetic variability of offspring. *Theriogenology* 88, 254-263. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.029>
- Gomes, M. F., Paula, V. D. C. S., Martins, L. R. R., Garcia, J. R. E., Yamamoto, F. Y., Freitas, A. M., 2021. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. *Chemosphere*, 263, 127985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127985>
- Jeziarska, B., Ługowska, K. & Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol Biochem* 35, 625–640 <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9284-4>
- Kowalski, R. K., Cejko, B. I., 2019. Sperm quality in fish: determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, pp. 94-108, [10.1016/j.theriogenology.2019.06.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009)
- Kubota, Y., Shimada, A., Shima, A., 1995. DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 330-334. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.330>
- Labbé, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maise, G., 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 60(3), 397-404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1102>
- Jia, P. Y., Guo, H. Y., Liu, B. S., Guo, L., Zhang, N., Zhu, K. C., Zhang, D. C., 2022. Effects of cryopreservation on the physiological characteristics and enzyme activities of yellowfin seabream sperm, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn 1782). *Aquaculture*, 549, 737739. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737739>

- Liley, N.R., Tamkee, P., Tsai, R., Hoysak, D.J., 2002. Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59 (2002), pp. 144-152. <https://doi.org/10.1139/f01-202>
- Machado, A. B. M., Drummond, G. M., Paglia, A. P., 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. In: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1420-1420.
- Marques, L. S., Gracia, L. F. G., Atehortúa, M. P., Rodrigues, R. B., dos Santos Teixeira, N., Oberst, E. R., Streit Jr, D. P., 2021. Urine, feces, and blood contamination of frozen and fresh tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) sperm. *Cryobiology*, 102, 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.07.003>
- Mylonas, C. C., Duncan, N. J., Asturiano, J. F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*, 472, 21-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021>
- Neumann, G., Sanches, P.V., Bombardelli, R.A., 2019. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. *Animal Reproduction Science* 201, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.01.001>
- Negrelli, D.C., Vieira, D.H.M.D., Tagliavini, V.P., Abdallah, V.D., De Azevedo, R.K., 2019. Molecular and morphological analysis of *Henneguya jundiai* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), a new parasite of the gills of *Rhamdia quelen* in Brazil. *Acta Trop.* 197, 105053. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105053>
- Palacios-Abrantes, J., Reygondeau, G., Wabnitz, C. C., Cheung, W. W., 2020. The transboundary nature of the world's exploited marine species. *Scientific reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74644-2>
- Palhares, P. C., Assis, I. D. L., Machado, G. J., de Freitas, R. M., de Freitas, M. B., Paula, D. A., Murgas, L. D., 2021. Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of *Brycon orbignyanus* cryopreserved with melatonin in different freezing curves. *Theriogenology*, 176, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.013>
- Pereira, C. R., Barcellos, L. J. G., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Ritter, F., Silva, L. B., 2006. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 1057-1063.
- Plante, M., de Lamirande, E., Gagnon, C., 1994. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and sterility*, 62(2), 387-393. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56895-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56895-2)
- Rana, K., 1995. Preservation of gametes. In: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Eds.) *Broodstock management and egg and larval quality* London: Blackwell Science, p.53-75.

- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., Kruif, A., 2004. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 61(7-8), 1589-1602.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.008>
- Ribeiro, R.I.M.A., Godinho, H.P., 2003. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piauaçu *Leporinus macrocephalus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 1. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000100011>
- Rodrigues, M.L., Damasceno, D.Z., Marques Gomes, R.L., Sosa, B. dos S., Moro, E.B., Sanches, E.A., Bittencourt, F., Signor, A., 2020. Reproductive physiology of *Rhamdia quelen* is improved by dietary inclusion of probiotics. *Aquac. Res.* 1–11.  
<https://doi.org/10.1111/are.15020>
- Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D. E., Ollevier, F., 1998. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 53(2), 402-413.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1-4), 1-28.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Baggio, D. M., Tessaro, L., Balen, R. E., & Bombardelli, R. A., 2011a. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 1163-1167. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>
- Sanches, E.A., Neumann, G., De Toledo, C.P.R., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E., 2011b. Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research*. 44, 534-541.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03056.x>
- Streit Jr., D.P., Moraes, G., Ribeiro, R., Povh, J., Souza, E., 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de Peixes. *Arquivo Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar* 7(2), 157–162. <https://doi.org/10.25110/arqvet.v7i2.2004.82>
- Taborsky, M., 1998. Sperm competition in fish:bourgeois' males and parasitic spawning. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(6), 222-227.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01318-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01318-9)
- Teixeira, N. S., Marques, L. S., Rodrigues, R. B., Gusso, D., Pinheiro, G. T., Machado, T. L. F., Streit Jr, D. P., 2021. Effects of anesthetic MS-222 on stress and reproduction of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*) males. *Animal Reproduction Science*, 225, 106669. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106669>
- Turner, C. E., Walborn, S. R., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Brinsko, S. P., LaCaze, K. A., Love, C. C., 2016. The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. *Theriogenology*, 86(6), 1399-1402.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.084>

- Viveiros, A. T. D. M., Godinho, H. P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 137-150. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>
- Voss, J. L., Pickett, B. W., & Shideler, R. K., 1976. The effect of hemospermia on fertility in horses. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. AI. Cracow*, 4, 1093.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661–672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>
- Własow, T., Glogowski, J., Cierieszko, A., 1999. Presence of blood cells in rainbow trout milt. *Fisheries & Aquatic Life*, 7(2), 359-364.
- Zalata, A. A., Christophe, A. B., Depuydt, C. E., Schoonjans, F., Comhaire, F. H., 1998. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *International journal of andrology*, 21(3), 154-162.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de sangue em concentrações de 5 e 10% não mostrou ser danosa ao sêmen de *R. quelen*, não ocasionando diminuição dos aspectos reprodutivos, podendo este material ser utilizado para fertilização, entretanto, maiores investigações são necessárias para esclarecer o nível mínimo de contaminação aceitável, bem como os períodos e temperaturas de armazenamento das amostras, pois a configuração sanguínea oferece riscos de estresse oxidativo, em casos de altas concentrações, ou até mesmo o aspecto do sangue ao contaminar, visto que a coloração amarronzada pode indicar células que já sofreram hemólise, e portanto, poderão causar maiores danos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMES, M. S. *et al.* Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 161, p. 119–128, 2015.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- BARCELLOS, L. J. G. *et al.* Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 229-236, 2004.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Chilled storage of sperm and eggs. *In*: CABRITA, E. *et al.* **Methods in reproductive aquaculture**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 241-258.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 530, [art.] 735724, 2021.
- BOWEN, J. M. Management of the breeding stallion. *In*: WALL, R. (ed.). **Current Therapy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals**. London: WB Saunders Company, 1986. p. 635–645.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa nº 44, de 1º de agosto de 2019. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 149, p. 9, 5 ago. 2019.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Gabinete do Ministro. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 36, p. 5, 22 fev. 2018.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Secretaria de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura. Departamento de Monitoramento e Controle. Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira. **Manual de coleta e remessa de amostras para diagnóstico de enfermidades de animais aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura - RENAQUA**. Brasília, DF: CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA, 2013. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasaniaanimal/files/2012/09/Manual-de-Coleta-e-Remessa1.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.
- CAROLSFELD, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.
- CIERESZKO, A. *et al.* Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 62, n. 7, p. 1353-1364, 2004.



CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, Mumbai, v. 4, n. 4, p. 303-306, 2013.

CORSO, M. N. Effects of different doses of eugenol on plasma cortisol levels and the quality of fresh and frozen-thawed sperm in South American catfish (*Rhamdia quelen*). **Theriogenology**, Amsterdam, v. 125, p. 135–139, 2019.

COSTA, B. B. *et al.* Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 35, p. 987–993, 2019.

DADRAS, H. *et al.* Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 729-740, 2017.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [Base de dados FAOSTAT]. Rome, 2018. Disponível em: [www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf](http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf). Acesso em: 5 dez. 2021.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [Base de dados FAOSTAT]. Rome, 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>. Acesso em: 5 dez. 2021.

FEIDEN, Aldi *et al.* Desempenho de juvenis de jundiás (*Rhamdia voulezi*) submetidos à alimentação com ração orgânica certificada e comercial. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 381-387, 2010.

GALO, Juliana Minardi *et al.* Oocyte quality of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the reproductive season. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, p. 279-284, 2015.

GOMES, D. P. *et al.* Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 878-886, 2011

GOES, M. D. *et al.* Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 88, p. 254-263, 2017.

GRESSLER, L. T. *et al.* Histological and antioxidant responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 2297-2306, 2016.

GRESSLER, L. T. *et al.* Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1061-1072, 2014.

HILBIG, C. C. *et al.* Effects of dietary fatty acids on the reproduction of South American female catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaiso, v. 47, n. 3, p. 456-466, 2019.

- JENEY, V. *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Washington, DC, v. 100 n. 3, p. 879-887, 2002.
- LE, M. H.; CHANG, Y. J.; ARUKWE, A. Properties and activities of blood-or seawater-contaminated wild-caught Striped Jewfish (*Stereolepis doederleini*) sperm. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 900-907, 2018.
- LINS, R. M. *et al.* Reproductive physiology of *Rhamdia quelen* is improved by dietary inclusion of probiotics. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 1677-1687, 2021.
- MAIOLINO, C. V. **Desenvolvimento inicial do crânio-mandíbula de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptaridae)**. 2019. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.
- MARQUES, L. S. *et al.* Urine, feces, and blood contamination of frozen and fresh tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) sperm. **Cryobiology**, Cambridge, v. 102, p. 121-126, 2021.
- MILIORINI, A. B. *et al.* A morphological classification proposal for Curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 177-187, 2011.
- NEGRELLI, D. C. *et al.* Molecular and morphological analysis of *Henneguya jundiai* n. sp. (Cnidaria: Myxosporae), a new parasite of the gills of *Rhamdia quelen* in Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 197, [art.] 105053, 2019.
- NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 201, p. 84-92, 2019.
- PAIVA, M. J. T. R. *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: EDUEM - Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- PALACIOS-ABRANTES, J.; SUMAILA, U. R.; CHEUNG, W. The transboundary nature of the world's exploited marine species. **Scientific Reports**, London, v. 10, [art.] 17668, 2020.
- PEREIRA, C. R. *et al.* Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, p. 1057-1063, 2006.
- RIJSSELAERE, T. *et al.* Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 61, n. 7/8, p. 1589-1602, 2004.
- ROOM, D. M. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. **Annual Review of Biomedical Sciences**, São Paulo, v. 10, p. 79-90, 2008.
- SANCHES, E. A. *et al.* Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, p. 1163-1167, 2011.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivo Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 157–162, 2004.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337–344, 2018.

TEIXEIRA, N. S. *et al.* Effects of anesthetic MS-222 on stress and reproduction of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*) males. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 225, [art.] 106669, 2021.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.

VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; SHIDELER, R. K. The effect of hemospermia on fertility in horses. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., 1976, Krakow. [**Proceedings of the ...**]. Krakow: The Congress, 1976. p. 1093.

WHELTON, P. K. *et al.* The effect of potassium supplementation in persons with a high-normal blood pressure: results from Phase I of the Trials of Hypertension Prevention (TOHP). **Annals of Epidemiology**, Atlanta, v. 5 n. 2, p. 5-95, 1995.

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**, Amsterdam, v. 67, p. 661–672, 2007.

ZALATA, A. A. *et al.* White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Madrid, v. 21, n. 3, p. 154-162, 1998.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. *In*: CYRINO, J. E. P. *et al.* (org.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 45-73.

## VITA

Raquel Santos dos Santos Filha de José Francisco dos Santos e Maria da Silva Santos, é natural de Curionópolis no estado do Pará, nascida em 13 de outubro de 1991.

Concluiu o ensino médio na escola Elza Maria Correa Dantas, em São Domingos do Araguaia, e a graduação em Marabá Pará, pela Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará-UNIFESSPA, no curso de bacharel em Ciências Biológicas em 2019.

Iniciou a Pós graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 2020, na área de concentração de Produção Animal, sendo bolsista CAPES. Nesse período realizou atividades de pesquisa e ensino no Grupo de Pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas), com foco principal no desenvolvimento e aprimoramentos de técnicas relacionadas as metodologias de reprodução, avaliação de qualidade e criopreservação de gametas de peixes e bem-estar animal.