

Determinação da concentração espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por espectrofotometria

Spectrophotometric method for determination of *Colossoma macropomum* (tambaqui) sperm concentration

Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley^{1*}, Marcelo José da Ascensão Feitosa Vieira¹, Thais Maia Torres¹, Marcos Luiz da Silva Apoliano², Carlos Henrique Sousa de Melo^{1,3}, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro¹, José Ferreira Nunes¹

¹ Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil.

² Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil.

³ Centro Universitário INTA (UNINTA), Sobral, Ceará, Brasil.

*Autor correspondente: sandra.salmito@uece.br

Resumo

Visando auxiliar o manejo reprodutivo de machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em piscicultura de laboratório e comercial, obteve-se um modelo de regressão linear a partir de curvas de concentração por método espectrofotométrico. Foram selecionados 22 machos de tambaqui com idade média de três anos. Eles foram divididos em dois grupos contendo 11 animais cada. Ambos os grupos receberam alternadamente uma única dose de extrato de hipófise de carpa (EHC; 2,0 mg/kg de peso corporal, intracelomático). O esperma foi coletado 14 horas após o tratamento hormonal e diluído (1:4000; esperma: solução salina formaldeído). A concentração foi estimada por contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer e por espectrofotômetro ($\lambda=540$ nm). A concentração espermática individual variou de 11,40 a $71,13 \times 10^9$ espermatozoides/mL. O grau de transmitância variou de 62,1 a 95,0%. Houve correlação significativa ($r^2 = 0,966$; $p < 0,0001$) entre a concentração espermática analisada em câmara de Neubauer e a transmitância em 540 nm. A análise por espectrofotometria e a predição pela equação $Y=100,293 - 0,509X$ mostrou ser um método eficiente e rápido para estimar a concentração espermática de tambaqui, podendo ser utilizado em procedimentos de rotina em laboratórios de reprodução artificial de peixes.

Palavras-chave: peixes; reprodução; sêmen.

Abstract

To assist the reproductive management of tambaqui (*Colossoma macropomum*) males in laboratory and commercial fish farming, a linear regression model was obtained from concentration curves using the spectrophotometric method. Twenty-two tambaqui males with an average age of three years old were selected and divided into two groups containing 11 animals each. Both groups alternately received a single dose of carp pituitary extract (CPE; 2.0 mg/kg body weight, intracelomic). Sperm was collected 14 h after hormonal treatment and diluted (1:4000; sperm:formaldehyde saline). The concentration was estimated by counting spermatozoa in a Neubauer chamber and by using a spectrophotometer ($\lambda=540$ nm). Individual sperm concentration ranged from 11.40 to 71.13×10^9 sperm/mL. The degree of transmittance ranged from 62.1% to 95.0%. There was a significant correlation ($r^2 = 0.966$; $p < 0.0001$) between sperm concentration analyzed in a Neubauer chamber and transmittance at 540 nm. Analysis by spectrophotometry and the prediction provided by the equation $Y=100.293 - 0.509X$ proved to be an efficient and fast method for estimating sperm concentration in tambaqui and can be used in routine procedures in artificial fish reproduction laboratories.

Keywords: fish; reproduction; semen.

1. Introdução

A concentração espermática é uma importante variável na análise de sêmen de peixe ⁽¹⁾. Monitorar e controlar essa variável é crucial para garantir resultados consistentes em relação à criopreservação de espermatozoides e inseminação artificial ⁽²⁾. Além disso, é considerado um indicador crucial para determinar a

qualidade do sêmen em termos de motilidade e morfologia ^(3, 4, 5). A concentração espermática pode ser usada para avaliar o volume de sêmen fresco ou pós-aquecimento que serão direcionados para procedimentos de fertilização artificial, ajudando a determinar a dose de inseminação mais adequada ^(6, 7). Também pode ser empregado para identificar a faixa de produção de sêmen

Recebido: 6 de dezembro de 2022. Aceito: 8 de março de 2023. Publicado: 10 de maio de 2023.



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

durante a estação reprodutiva^(8, 9), a resposta ao tratamento hormonal⁽¹⁰⁾ e as diferenças entre machos criados e selvagens⁽⁴⁾.

A concentração espermática pode ser estimada por (a) contagem de espermatozoides usando um hemocitômetro, (b) leitura de espermátocrito, (c) citometria de fluxo e (d) densidade óptica por espectrofotometria. O primeiro método (a) é preciso, mas requer muita prática e tempo para ser executado, o que pode levar à perda da qualidade do sêmen em procedimentos de criopreservação e fertilização artificial, pois essas biotécnicas exigem um manuseio rápido entre a coleta do sêmen e sua manipulação^(11, 12). O segundo método (b) é uma abordagem rápida e prática que é facilmente implementada no campo; no entanto, os resultados às vezes não mostram correlações lineares com os obtidos pelo hemocitômetro ou espectrofotômetro^(13, 14). O método (c) consiste na análise indireta da concentração celular usando comparações de fluorescência, mas esta técnica está sujeita a críticas, pois pode superestimar a concentração espermática devido a diferentes padrões de fluorescência causados por artefatos também encontrados no sêmen^(15, 16). O último método (d) avalia a relação linear entre concentração de partículas e absorção de luz⁽¹⁷⁾. Requer calibração inicial com leitura por hemocitômetro e fornece índices precisos de correlação com a concentração espermática⁽¹⁸⁾.

Embora o uso do espectrofotômetro seja limitado devido ao seu alto custo, este método tem sido empregado experimentalmente para auxiliar análises relacionadas à criopreservação de espermatozoides de espécies cultivadas ou ameaçadas de extinção, pois é capaz de determinar rapidamente a concentração espermática^(19, 20).

Durante os procedimentos de fertilização artificial, algumas fazendas comerciais de peixes podem não verificar a qualidade reprodutiva dos machos por meio da análise de sêmen. Geralmente o sêmen é simplesmente coletado e adicionado sobre os ovócitos sem avaliação prévia de sua motilidade ou concentração, ou mesmo definição da dose adequada de inseminação. No entanto, essas variáveis são essenciais para selecionar machos que produzam espermatozoides de maior qualidade, além de permitir um maior aproveitamento do volume de sêmen de um único macho para obter um maior número de doses, podendo inseminar mais ovócitos. Para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), apesar de sua importância econômica, social e ecológica⁽²¹⁾, existem poucas informações sobre as características espermáticas, principalmente sobre a concentração⁽⁵⁾. Tais medidas são importantes para garantir o abastecimento constante de pescado a este mercado em ascensão, onde o tambaqui se destaca pela sua valorização dos consumidores.

A análise de concentração espermática, com o método espectrofotométrico, é uma alternativa confiável. Usando dados brutos, pode-se obter uma equação

preditiva que permite uma manipulação mais rápida e eficiente de sêmen fresco ou congelado.

Além disso, esta técnica pode fornecer uma seleção rápida de machos com características reprodutivas adequadas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a concentração espermática de machos de tambaqui induzidos hormonalmente para (1) determinar valores de transmitância por espectrofotometria e correlacionar com os resultados obtidos por análise em câmara de Neubauer (hemocitômetro), (2) calcular curvas de calibração e (3) gerar um modelo matemático capaz de prever a concentração de espermática.

2. Material e métodos

O sêmen foi coletado mensalmente, durante um ano, no Centro de Pesquisa em Aquicultura (CPAq) do DNOCS, localizado em Pentecoste - CE, Brasil, (003°45'00" S; 39°10'24" W). A temperatura ambiente média na região foi de 26,8 °C, com máxima de 34,0 °C e mínima de 20,6 °C. A precipitação média anual foi de 860 mm⁽²²⁾. As análises espermáticas foram realizadas no laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), em Fortaleza - CE, Brasil.

Vinte e dois (n=22) tambaqui (*Colossoma macropomum*; Cuvier, 1818) machos com idade média de três anos (5.431,00 ± 29,70 g; 68,00 ± 4,25 cm), apresentando características indicativas de maturidade reprodutiva, como papila urogenital hiperêmica e fácil liberação de sêmen por pressão abdominal suave, foram selecionados. Os peixes foram identificados pela leitura de seus chips eletrônicos e distribuídos aleatoriamente em dois tanques de terra de 350 m², representando dois grupos experimentais (controle e tratamento), com 11 machos cada. Durante todo o experimento, os machos foram alimentados com ração comercial (fase de terminação, contendo 32% de proteína bruta, a 5% do peso corporal) duas vezes ao dia.

Os animais do grupo de tratamento (11 machos) foram induzidos com uma única injeção intracelômica de extrato de hipófise de carpa (CPE; *Cyprinus carpio*, 2,0 mg/kg de peso corporal) e seus espermatozoides foram coletados 14 h após a indução. Os machos do grupo controle não foram tratados com nenhum tipo de indução hormonal. As coletas de sêmen foram realizadas mensalmente em ambos os grupos por 12 meses.

Antes das coletas de sêmen, os machos foram sedados com uma solução de eugenol na proporção de 1:10:10.000 (eugenol:álcool:água do tanque) para minimizar o estresse. Em seguida, cada macho foi colocado sobre uma esponja com os olhos e região caudal envoltos em um pano úmido para facilitar sua contenção e diminuir os estímulos visuais. A região genital foi limpa com uma toalha de papel para evitar a contaminação do

sêmen com sangue, fezes, urina ou água. Uma leve pressão abdominal foi aplicada para liberar o sêmen⁽²³⁾, que foi coletado em tubos Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, os espermatozoides de cada macho foram fixados em solução salina fisiológica com formaldeído a 1%, na proporção de 1:4000 (espermatozoide:fixador).

Desta amostra fixada, 10 µL foram colocados em uma câmara de Neubauer sob um microscópio de contraste de fase com ampliação de 400x. A contagem de espermatozoides foi realizada em cinco quadrantes, em ambas as grades, 15 min após a sedimentação. Três réplicas foram feitas por amostra. Em seguida, as médias obtidas das contagens de espermatozoides nas duas grades foram multiplicadas pelo fator 200×10^6 (adaptado de 24).

Para a leitura do espectrofotômetro, o equipamento foi inicialmente calibrado com solução salina de formaldeído 1% a 100% de transmitância. Em seguida, 4 mL de cada amostra fixada foram colocados em uma cubeta de cristal em um Espectrofotômetro digital 35-D (Coleman, São Paulo-SP, Brasil). Um comprimento de onda de $\lambda=540$ nm foi usado para mitigar grande parte das interferências, e três leituras de transmitância foram realizadas por amostra.

Os resultados das concentrações espermáticas obtidos pelo método espectrofotométrico e pela câmara do hemocitômetro de Neubauer foram expressos como média \pm erro padrão e submetidos à análise de correlação linear de Pearson ($p < 0,001$). Os resultados de transmitância foram submetidos à transformação 2-log (SAS 9.0, 2002). A equação de predição gerada a partir dos dados foi usada para construir a tabela de concentração de esperma em relação à transmitância. As

variáveis porcentagem de transmitância e concentração espermática foram submetidas à análise de variância (ANOVA). No caso de diferenças significativas, o teste de Student-Newman-Keuls foi usado para uma comparação de médias pareada. O nível de significância adotado foi de 5%. O software “SigmaPlot 12.0” foi utilizado na análise estatística dos resultados. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UECE (parecer nº 10974342/2022).

3. Resultados

As amostras de sêmen fresco coletadas após o tratamento hormonal tiveram um volume médio de $5,05 \pm 2,08$ mL e uma concentração média de esperma de $21,79 \pm 4,02 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Os machos do grupo controle produziram sêmen com volume e concentração médios de $0,55 \pm 0,52$ mL e $49,98 \pm 18,63 \times 10^9$ espermatozoides/mL, respectivamente. Assim, machos induzidos hormonalmente produziram maior volume seminal e menor concentração espermática ($p < 0,05$).

A Tabela 1 apresenta os dados médios de concentração espermática de cada animal ($n=22$), obtidos por contagem em câmara de Neubauer (10^9 espermatozoides/mL), e suas respectivas transmitâncias obtidas por espectrofotometria ($\lambda = 540$ nm). Com esses dados, um modelo linear foi obtido ($Y = 100,293 - 0,509X$), no qual $Y =$ transmitância e $X =$ concentração espermática (Fig. 1). Com base nessa equação, cada aumento de unidade na concentração (ou seja, para cada bilhão de espermatozoides/mL) foi estimado para reduzir a transmitância em 0,51% ($p < 0,0001$).

Tabela 1. Porcentagens de transmitância em espectrofotômetro ($\lambda = 540$ nm) e concentração espermática em câmara de Neubauer (esperma $\times 10^9$ /mL) em dois grupos (Controle e Tratamento), apresentadas individualmente por animal. Pentecoste - CE, Brasil.

Tratamento			Controle		
Número do animal	Transmitância (%)	Concentração espermática $\times 10^9$ sperm/mL	Número do animal	Transmitância (%)	Concentração espermática $\times 10^9$ sperm/mL
1	95,0	11,40	12	90,0	20,00
2	89,0	19,86	13	83,0	29,20
3	89,5	20,60	14	86,0	30,60
4	87,0	21,73	15	86,4	33,60
5	87,0	21,86	16	78,2	50,20
6	88,5	22,26	17	72,2	53,26
7	88,3	22,50	18	69,0	57,86
8	89,3	23,66	19	68,1	68,40
9	87,8	24,00	20	66,8	68,43
10	88,8	24,26	21	62,1	71,13
11	89,2	27,53	22	63,9	67,20
Média*	$89,04 \pm 2,16^a$	$21,79 \pm 4,02^B$		$75,06 \pm 9,99^b$	$49,98 \pm 18,63^A$

* As letras minúsculas representam a comparação entre as transmitâncias, enquanto as letras maiúsculas representam a comparação da concentração de espermatozoides. Médias com letras minúsculas distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

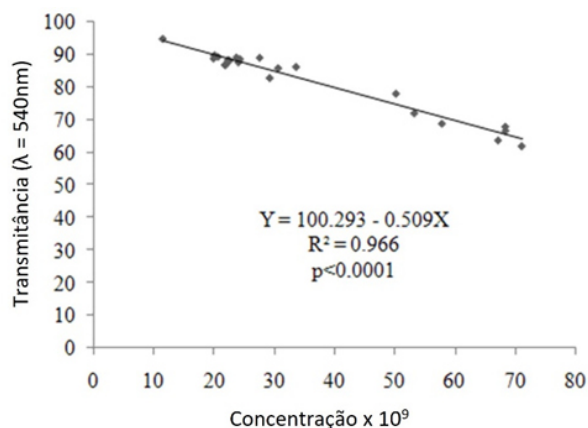


Figura 1. Curva de concentração espermática de tambaqui (*C. macropomum*) obtida pela correlação entre porcentagem de transmitância utilizando espectrofotômetro ($\lambda = 540 \text{ nm}$) e concentração espermática obtida em câmara de Neubauer (esperma $\times 10^9/\text{mL}$). Dados coletados em Pentecoste - CE, Brasil.

A Tabela 2 apresenta os valores estimados da

concentração espermática do tambaqui em relação aos respectivos percentuais de transmitância calculados pela equação. Uma correlação linear inversamente proporcional foi observada entre a concentração de espermatozoides em uma câmara de Neubauer e a transmitância em 540 nm (Fig. 1; $Y = 100,293 - 0,509X$), com um coeficiente de determinação altamente significativo ($R^2 = 0,966$, $p < 0,0001$), obedecendo assim a lei de Lambert-Beer.

4. Discussão

Estudos anteriores relataram que o uso de tratamento hormonal com CPE pode resultar na produção de sêmen mais diluído^(5, 25, 26, 27). Isso ocorre devido à maior hidratação testicular, que aumenta o volume de fluido no sêmen, reduzindo a concentração de espermatozoides^(28, 29, 30). Porém, quando esta diluição ocorre em espécies com maior concentração espermática, como o tambaqui, oferece a possibilidade de melhor aproveitamento espermático, pois podem gerar várias doses inseminantes.

Tabela 2. Simulação da porcentagem de transmitância (% T) obtida por espectrofotômetro ($\lambda = 540 \text{ nm}$) e concentração espermática de tambaqui ($\text{SPTZ} \times 10^9/\text{mL}$) estimada pela equação de predição $Y = 100,293 - 0,509X$. Pentecoste - CE, Brasil.

% T	SPTZ $\times 10^9/\text{mL}$	% T	SPTZ $\times 10^9/\text{mL}$	% T	SPTZ $\times 10^9/\text{mL}$	% T	SPTZ $\times 10^9/\text{mL}$	% T	SPTZ $\times 10^9/\text{mL}$
0	198,18	20	158,62	40	119,05	60	79,49	80	39,92
1	196,20	21	156,64	41	117,07	61	77,51	81	37,94
2	194,22	22	154,66	42	115,09	62	75,53	82	35,96
3	192,25	23	152,86	43	113,12	63	73,55	83	33,99
4	190,27	24	150,70	44	111,14	64	71,57	84	32,01
5	188,29	25	148,72	45	109,16	65	69,59	85	30,03
6	186,31	26	146,75	46	107,18	66	67,62	86	28,05
7	184,33	27	144,77	47	105,20	67	65,64	87	26,07
8	182,35	28	142,79	48	103,22	68	63,66	88	24,09
9	180,38	29	140,81	49	101,25	69	61,68	89	22,12
10	178,40	30	138,83	50	99,27	70	59,70	90	20,14
11	176,42	31	136,85	51	97,29	71	57,73	91	18,16
12	174,44	32	134,88	52	95,31	72	55,75	92	16,18
13	172,46	33	132,90	53	93,33	73	53,77	93	14,20
14	170,48	34	130,92	54	91,36	74	51,79	94	12,23
15	168,51	35	128,94	55	89,38	75	49,81	95	10,25
16	166,53	36	126,96	56	87,40	76	47,83	96	8,27
17	164,55	37	124,99	57	85,42	77	45,86	97	6,29
18	162,57	38	123,01	58	83,44	78	43,88	98	4,31
19	160,59	39	121,03	59	81,46	79	41,90	99	2,33

Maria e outros⁽⁵⁾ relataram maiores volumes de sêmen de tambaqui quando duas doses hormonais (0,25 e 2,5 mg/kg) foram injetadas. Neste caso, foram coletados 12,6 mL de sêmen por macho. Outros autores obtiveram resultados mais semelhantes ao presente experimento, descrevendo volumes menores de sêmen de tambaqui após o uso de CPE (Leite et al.⁽⁷⁾ - 4,5 mL; Oliveira et al.⁽³¹⁾ - 4,3 mL; Martins et al.⁽³²⁾ - 3,3 mL).

Em relação à concentração espermática, nossos resultados foram semelhantes aos de Leite et al.⁽⁷⁾ e

Oliveira et al.⁽³³⁾ ($19,0 \times 10^9$ e $20,63 \times 10^9$ espermatozoides/mL, respectivamente). Em contraste, Maria et al.⁽⁵⁾ e Martins et al.⁽³²⁾ observaram concentrações menores ($7,9 \times 10^9$ e $10,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL, nesta ordem) do que as aqui apresentadas, também com indução hormonal à reprodução ($21,79 \times 10^9$ espermatozoides/mL).

Neste estudo, a concentração espermática ($49,98 \times 10^9$ espermatozoides/mL) do tambaqui não induzido foi maior do que a encontrada por Martins et al.⁽³²⁾ ($7,9 \times 10^9$

espermatozoides/mL), que utilizaram apenas solução salina (NaCl 0,9%) sem adição de hormônio. Como esperado, o volume espermático (0,55 mL) foi inferior ao relatado em outros estudos, que aplicaram 2,5 mg CPE/kg (4,31 mL) ⁽³¹⁾ ou 1,5 mg CPE/kg (2,32 mL) ⁽³³⁾, corroborando a afirmação que os indutores hormonais da reprodução agem para aumentar a produção de plasma seminal ^(29, 30).

Essas variações na concentração de espermatozoides em indivíduos do mesmo gênero ou espécie estão ligadas à estação do ano ^(8, 9), estado nutricional ^(3, 34), qualidade da água ⁽³⁵⁾, peso do animal ⁽¹⁴⁾ e tipo e dose de o hormônio usado ^(10, 27). Por exemplo, em um experimento avaliando o desempenho reprodutivo de *Brycon orbygnianus* e *Prochilodus lineatus* tratados com extrato de busserina, Paulino et al. ⁽¹⁰⁾ observaram que esse indutor hormonal forneceu uma resposta mais homogênea na concentração espermática de *P. lineatus* em comparação com *B. orbygnianus*. Esse resultado sugere maior afinidade entre os receptores da espécie e o extrato de busserina.

Um coeficiente de determinação significativo ($R^2 = 0,966$) foi obtido pela correlação linear entre a concentração espermática analisada em câmara de Neubauer e a transmitância determinada em espectrofotômetro estando de acordo com a lei de Lambert-Beer, que sugere que as intensidades de radiação incidente e emergente podem estar relacionadas com a concentração de material presente na solução.

Segundo Ciereszko e Dabrowski ⁽¹⁹⁾, a linearidade das correlações entre densidade óptica e densidade espermática oferece uma boa correlação ($r = 1$) em comprimentos de onda entre 400 e 700 nm, mostrando-se um método rápido para estimar o número de células espermáticas por mililitro. No entanto, a precisão das determinações é influenciada por fatores como o tipo de hemocítmetro usado ⁽³⁶⁾, a experiência do observador ⁽³⁷⁾ e a taxa de diluição da amostra ⁽¹⁹⁾.

Ao utilizar esse método espectrofotométrico, é preciso atenção redobrada para evitar a contaminação do sêmen com sangue, fezes ou urina, pois esses contaminantes interferem na leitura espectrofotométrica devido à diluição e alteração da cor da amostra. De acordo com Loir et al. ⁽³⁸⁾ e Ciereszko e Dabrowski ⁽¹⁹⁾, a interferência das proteínas do plasma seminal parece ser insignificante, uma vez que a concentração de proteínas no esperma de peixe é muito baixa ⁽³⁹⁾, e principalmente se associada à escolha de comprimentos de onda acima de 400 nm.

5. Conclusão

A análise da concentração espermática pelo método espectrofotométrico em $\lambda = 540$ nm é eficiente e pode ser adotada como protocolo de rotina para

determinação da concentração espermática em fins comerciais e de pesquisa. Assim, permite estimar a concentração espermática de forma precisa e fácil e proporciona uma diluição mais precisa dos espermatozoides para obter um maior número de doses, que podem ser utilizadas para fertilizar mais ovócitos.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: C. S. B. Salmito-Vanderley e J. F. Nunes. *Curadoria de dados:* M. J. da A. F. Vieira e T. M. Torres. *Análise Formal:* M. J. da A. F. Vieira e T. M. Torres. *Aquisição de financiamento:* C. S. B. Salmito-Vanderley e J. F. Nunes. *Investigação:* M. L. da S. Apoliano e C. H. S. Melo. *Metodologia:* M. J. da A. F. Vieira e C. C. de M. Salgueiro. *Administração do projeto:* C. S. B. Salmito-Vanderley e C. C. de M. Salgueiro. *Redação (rascunho original):* Salmito-Vanderley e M. J. da A. F. Vieira. *Redação (revisão e edição):* M. L. da S. Apoliano, C. H. S. Melo e T. M. Torres.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CPAq-DNOCS-Ceará e à FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) – Brasil pelo apoio financeiro. Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001.

Referências

1. Nynca J, Dietrich GJ, Liszewska E, Judycka S, Karol H, Dobosz S, Krom J, Ciereszko, A. Usefulness of a portable flow cytometer for sperm concentration and viability measurements of rainbow trout spermatozoa. *Aquaculture*. 2016; 451:353-356. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848615301873>).
2. Yang H, Daly J, Tiersch TR. Determination of sperm concentration using flow cytometry with simultaneous analysis of sperm plasma membrane integrity in zebrafish *Danio rerio*. *Cytometry Part A*. 2016; 89(4):350-356. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26580311/>).
3. Kowalski RA, Cejko BI. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*. 2019; 135:94-108. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31203093/>).
4. Magnotti C, Figueroa E, Farias JG, Merino O, Valdebenito I, Oliveira RPS, Cerqueira V. Sperm characteristics of wild and captive lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), subjected to sperm activation in different pH and salinity conditions. *Animal Reproduction Science*. 2018; 192:164-170. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29555193/>).
5. Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Silva CA, Carneiro PCF. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Applied Ichthyology [Internet]*. 2010 [cited 2022 Dez 01]; 26(5):779-783. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0426.2010.01542.x>.
6. Kwantong S, Bart AN. Fertilization efficiency of cryopre-

- served sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), Aquaculture Research [Internet]. 2009 [cited 2022 Dez 01]; 40(3):292-297. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2008.02088.x>.
7. Leite LV, Melo MAP, Oliveira FCE, Pinheiro JPS, Campello CC, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2013; 65(2):421-429. (<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/Rg3Z4NmnC395s8cPbnk6BNr/?lang=pt>).
8. Cejko BI, Sarosiek B, Krejszef S, Kowalski RK. Multiple collections of common carp *Cyprinus carpio* L. semen during the reproductive period and its effects on sperm quality. Animal Reproduction Science. 2018; 188:178-188. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29223503/>).
9. Egger RC, Motta NC, Franca TDS, Oliveira AV, Fernandes-Braga W, Alvarez-Leite JI, Murgas LDS. Sperm cryopreservation of *Prochilodus lineatus* throughout the same reproductive season. Aquaculture Research [Internet]. 2021 [cited 2022 Dez 01]; 52(12):6453-6463. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.15513>.
10. Paulino MS, Miliorini AB, Murgas LDS, Felizardo VO. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. Boletim do Instituto de Pesca [Internet]. 2018 [cited 2022 Dez 01]; 37(1):39-45. Disponível em: https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/37_p1_39-45.pdf.
11. Cruz-Casallas PE, Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM. Seasonal variation of sperm quality and the relationship between spermatocrit and sperm concentration in Yamu *Brycon amazonicus*. North American Jour of Aquaculture [Internet]. 2007 [cited 2022 Dez 01]; 69(2):159-165. Disponível em: <https://afspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1577/a06-002.1>.
12. Dong Q, Eudeline B, Huang C, Tiersch TR. Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture Research [Internet]. 2005 [cited 2022 Dez 01]; 36(1):86-93. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2004.01188.x>.
13. Sanches EA, Marcos RM, Baggio DM, Tessaro L, Balen RE, Bombardelli RA. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. Revista Brasileira de Zootecnia [Internet]. 2011 [cited 2022 Dez 03]; 40(6):1163-1167. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/yQR8SRQwsgbFxnPXGn5xsh?lang=pt>.
14. Shimoda E, Andrade DR, Vidal JMV, Yasui GS, Godinho HP, Silva JFS, Sousa G. Utilização do espermatócrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science [Internet]. 2007 [cited 2022 Dez 04]; 44:19-24. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26585>.
15. Lu JC, Chen F, Xu HR, Wu YM, Xia XY, Huang YF, Lu NQ. Is flow cytometry really adapted to the determination of sperm concentration? Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2007; 67(4):394-401. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17558894/>).
16. Petrunkina AM, Harrison RAP. Systematic misestimation of cell subpopulations by flow cytometry: a mathematical analysis. Theriogenology. 2010; 73(7):839-847. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19896183/>).
17. Cuevas-Urbe R, Tiersch TR. Estimation of fish sperm concentration by use of spectrophotometry. Cryopreservation in Aquatic Species. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society; 2011. p. 162-200.
18. Leclercq E, Antoni L, Bardon-Albaret A, Anderson CR, Somerset CR, Saillant EA. Spectrophotometric determination of sperm concentration and short-term cold-storage of sperm in Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* L. broodstock. Aquaculture Research [Internet]. 2013 [cited 2022 Dez 04]; 45(8):1-12. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.12073>.
19. Ciereszko A, Dabrowski K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture. 1993; 109 (3-4):367-373. ([https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90175-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90175-X))
20. Hassan MM, Qin JG, Li X. Development of a spectrophotometric technique for sperm quantification in the spermcasting Australian flat oyster *Ostrea angasi* Sowerby. Aquaculture Research [Internet]. 2017 [cited 2022 Dez 02]; 48(9): 4844-4850. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.13304>.
21. Hilsdorf AWS, Hallerman E, Valladão GMR, Zaminhan-Hassemer M, Hashimoto DT, Dairiki JK, Takahashi LS, Albergaria FC, Gomes MES, Venturieri RLL, Moreira RG, Cyrino JEP. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. Reviews in Aquaculture [Internet]. 2021 [cited 2022 Nov 22]; 14(2): 993-1027. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/raq.12638>.
22. FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos Fortaleza: Relatório de Pluviometria por faixa de anos - Estado do Ceara, 1974-2008, anos 2007 e 2008, Município: Pentecoste, Posto: Pentecoste, Micro-região:11, Código: 115, Resumo de chuvas nos dados fornecidos pela FUNCEME [Internet]. 2009 [cited 2009 Jun 15]. Disponível em: <http://www.funceme.br/rams/htm>.
23. Fontenele O. Método de hipofisação de peixes adotado pelo DNOCS. 1st ed. Fortaleza: DNOCS; 1981. p. 33. Portuguese.
24. Silveira WF, Kavamoto ET, Rigolino MG, Tabata YAO. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. Boletim do Instituto da Pesca [Internet]. 1987 [cited 2022 Jun 20]; 14(1):69-73. Disponível em: https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/sumario14_unico.htm.
25. Viveiros ATM, Fessehay Y, Ter-Veld M, Schulz RW, Komen J. Hand - stripping of semen and quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 2002; 213:373-386. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848602000364?via%3Dihub>).
26. Zaniboni-Filho E, Weingartner M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev Bras Reprod Anim [Internet]. 2007 [cited 2022 Jun 17]; 31(3):367-373. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/367.pdf>.
27. Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. Zygote. 2012; 20(1):39-43. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21208496/>).
28. Órfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Cosson J, Viveiros ATM. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). Aquaculture. 2011; 311:241-247. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848610008148?via%3Dihub>).
29. Mylonas, CC; Duncan, NJ; Asturiano, JF. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. Aquaculture. 2017; 472:21-44.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484861630206X?via%3Dihub>).

30.Caldas JS, Silva ALS, Sousa LM, Sousa EB, Monteiro ILP, Barros FJT, Godoy, L. et al. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and semen quality in the endangered Amazonian fish *Hypancistrus zebra* (*Siluriformes, Loricariidae*). *Aquaculture*. 2021; 533:736140. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848620338461?via%3Dihub>).

31.Oliveira MS, Almeida-Monteiro PS, Nunes LT, Linhares FRA, Pinheiro JPS, Pinheiro RRR, Ferreira FO, Campelo CC, Salmito-Vanderley CSB. Cryopreservation of tambaqui semen using a dry shipper and a programmed freezing machine. *Seminária: Ciências Agrárias* [Internet]. 2016 [cited 2022 Ago 20]; 37(4):2167-2180. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/21997/19459>.

32.Martins EFF, Streit Jr DP, Abreu JS, Correia-Filho RAC, Oliveira CAL, Lopera-Barrero NM, Povh JA. Ovipel and carp pituitary extract for the reproductive induction of *Colossoma macropomum* males. *Theriogenology*. 2017; 98(1):57-61. (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.047>).

33.Oliveira FCE, Salmito-Vanderley CSB, Torres TM, Leite-Castro LV, Salgueiro CCM, Linhares FRA, Sales, Y. S, Nunes JF. Powdered coconut water with cryoprotectant can be used for cooling and future freezing of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. *Journal of Applied Ichthyology* [Internet]. 2022 [cited 2022 Ago 20]; 38(3): 275-284. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jai.14303>.

34.Cabrita E, Martínez-Páramo S, Gavaia PJ, Riesco MF, Valcarce DG, Sarasquete C, Robles V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*. 2014; 432: 389-401. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848614002105?via%3Dihub>).

35.Nunes LT, Salmito-Vanderley CSB, Reis FYT, Neres RWP, Silva SQ. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. *R. Bras. Reprod. Anim* [Internet]. 2018 [cited 2022 Ago 20]; 42(1): 15-21. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n1/p15-21%20\(RB722\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n1/p15-21%20(RB722).pdf).

36.Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 2005; 63(4): 992-1003. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15710187/>).

37.Björndahl MT, Christopher LR, Barratt. Raising Standards in Andrology Semen Analysis: Professional and Personal Responsibility. *Journal of Andrology*. 2004; 25(6): 862-863. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15477354/>).

38.Loier M, Labbe C, Maisse G, Pinson A, Boulard G, Mourot B. Proteins of seminal fluid and spermatozoa in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): partial characterization and variations. *Fish Physiology and Biochemistry*. 1990; 8(6): 485-495. DOI: (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24221035/>).

39.Scott A P, Baynes SM. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* [Internet]. 2006 [cited 2022 Ago 20]; 17(6):707-739. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02804.x>.