

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de 28/02/2027.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU – Campus Botucatu**

**STELLA INDIRA ROCHA LOBATO**

Criopreservação de sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* com  
suplementação de antioxidantes

Ilha Solteira – SP

2025

**STELLA INDIRA ROCHA LOBATO**

Criopreservação de sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* com  
suplementação de antioxidantes

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Área de concentração: Zoologia).

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

Ilha Solteira – SP

2025

L796c	<p>Lobato, Stella Indira Rocha</p> <p>Criopreservação de sêmen de <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> com suplementação de antioxidantes / Stella Indira Rocha Lobato. -- Botucatu, 2025</p> <p>82 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu</p> <p>Orientador: Alexandre Ninhaus-Silveira</p> <p>1. Criopreservação. 2. Reprodução de peixe. 3. Antioxidante. 4. Siluriforme. 5. Pintado. I. Título.</p>
-------	--

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Criopreservação de sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* com suplementação de antioxidante

**AUTORA: STELLA INDIRA ROCHA LOBATO**

**ORIENTADOR: ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira UNESP


Prof. Dr. DANILO PEDRO STREIT JUNIOR (Participação Virtual)  
Ciência Animal / Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI (Participação Virtual)  
Centro de Aquicultura de Jaboticabal / UNESP/CAUNESP

Profa. Dra. MÔNICA RODRIGUES FERREIRA MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Morfofisiologia / UFJ - Universidade Federal de Jataí

Pós-doutorando THALES DE SOUZA FRANÇA (Participação Virtual)  
Departamento de Ciência Animal / Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Botucatu, 28 de fevereiro de 2025

Documento assinado digitalmente  
 MARIA VICTORIA RAMALHO DA CUNHA  
Data: 10/03/2025 15:16:57-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Maria Victória Ramalho da Cunha  
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação  
Instituto de Biociências de Botucatu

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adelci e Maridete, por todo o amor incondicional, apoio, esforços, confiança, companheirismo e por acreditarem no meu potencial. Vocês são a razão de todas as minhas conquistas!

Aos meus irmãos, Marcio e Matheus, pelo companheirismo e, acima de tudo, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. E aos meus sobrinhos, Alice, Luiz Felipe e Isaac, o carinho demonstrado em cada ligação são incalculáveis. O colar do Piauí é o meu suporte nos dias difíceis. Mesmo com a distância o meu coração é todo de vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira, por me apoiar e confiar no meu trabalho durante todos estes anos do doutorado. Sou profundamente grata pela confiança, paciência, calma e todo o conhecimento adquirido.

Às colegas do Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.Neo), por toda ajuda direta ou indireta. Vocês foram essenciais nesta trajetória. Um agradecimento especial a Laícia, Lais, Lorena e Yasmin, por todo o apoio durante esta fase de trabalho e desenvolvimento da pesquisa. Sem vocês, nada disso seria possível! Luciane, Luana, Barbara e Maiara, obrigada pelas risadas, apoio e por tornar essa caminhada solitária mais leve! E a Profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira, pela constante ajuda e apoio, muito obrigada.

Aos meus amigos de longa data, que foram essenciais para essa conquista. Cada mensagem e ligação eram motivos de alegria e me davam força para seguir em frente!!

À Piscicultura Piraí, por disponibilizar todos os animais necessário para esta pesquisa. Em especial a família Kasai, pelos ensinamentos, paciência e confiança nesses últimos anos de pesquisa, muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro ao projeto.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e a todos os funcionários, por me acolherem tão bem neste ciclo e me possibilitarem realizar este sonho, minha eterna gratidão.

Aos professores Carmina Salmito-Vanderley e Leandro Godoy, por aceitarem participar da minha banca de qualificação de doutorado. Aos pesquisadores Danilo Streit Jr., Sergio Batlouni, Mônica Machado e Thales França, por terem aceitado participar da minha banca de defesa de doutorado, desde já agradeço por cada sugestão, cada apontamento e contribuição! Minha eterna gratidão pelos ensinamentos e conselhos.

Com carinho, meu muito obrigada!

“àqueles que, de passo em passo,  
caminham rumo aos seus sonhos.”

(Laura Amorim – Se não fosse por você)

## RESUMO

Esta tese teve como objetivo principal o desenvolvimento e o aprimoramento de um protocolo eficaz de criopreservação espermática para a espécie *Pseudoplatystoma corruscans*, com ênfase na avaliação do uso de antioxidantes – cisteína e taurina – na preservação da qualidade espermática pós-descongelamento. O estudo está estruturado em dois capítulos experimentais complementares. No primeiro capítulo, investigou-se a eficiência de diferentes crioprotetores (dimetilacetamida e metanol), a ocorrência de aglutinação espermática e o efeito da suplementação com cisteína nas soluções crioprotetoras. Além disso, avaliou-se a influência de diferentes soluções ativadoras (água destilada e NaCl 0,45%) na motilidade espermática ao longo do tempo pós-descongelamento. Os resultados indicaram que o metanol foi mais eficiente que a dimetilacetamida, apresentando menor grau de aglutinação e motilidade satisfatória. Observou-se que apenas os espermatozoides isolados apresentaram aglutinação, e que a solução de NaCl retardou a queda da motilidade espermática em comparação à ativação com água. A cisteína demonstrou-se segura em todas as concentrações testadas, sendo que a dose de 2 mM associada à ativação com NaCl proporcionou maior estabilidade da motilidade ao longo do tempo, enquanto a concentração de 1 mM reduziu significativamente os danos morfológicos. No entanto, não foram observadas melhorias na taxa de eclosão com a adição de cisteína. No segundo capítulo, avaliou-se o efeito da taurina como antioxidante no meio crioprotetor, testando-se as concentrações de 1, 2 e 4 mM. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nos parâmetros cinéticos entre os tratamentos, as concentrações de 1 e 2 mM promoveram aumento da integridade de membrana dos espermatozoides. A suplementação com 2 mM de taurina resultou ainda em maior percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e em menor incidência de defeitos primários e secundários. De forma geral, os resultados obtidos nesta tese contribuem para o refinamento de técnicas de criopreservação em peixes, demonstrando o potencial do uso de antioxidantes na preservação da qualidade espermática de *P. corruscans*. O conhecimento gerado é relevante para programas de conservação, reprodução assistida e formação de bancos de germoplasma voltados à preservação de espécies nativas ameaçadas.

**Palavras-chave:** antioxidante, bagre, pintado, siluriforme, sêmen, criopreservação

## ABSTRACT

The main objective of this thesis was the development and improvement of an effective sperm cryopreservation protocol for the species *Pseudoplatystoma corruscans*, with emphasis on evaluating the use of antioxidants—cysteine and taurine—in preserving post-thaw sperm quality. The study is structured into two complementary experimental chapters. In the first chapter, the efficiency of different cryoprotectants (dimethylacetamide and methanol), the occurrence of sperm agglutination, and the effect of cysteine supplementation in cryoprotective solutions were investigated. Additionally, the influence of different activating solutions (distilled water and 0.45% NaCl) on sperm motility over time post-thaw was evaluated. The results indicated that methanol was more effective than dimethylacetamide, showing less agglutination and satisfactory motility. It was observed that only isolated sperm cells exhibited agglutination and that the NaCl solution slowed the decline in motility compared to activation with water. Cysteine was found to be safe at all tested concentrations; the 2 mM dose combined with NaCl activation promoted greater motility stability over time, while the 1 mM concentration significantly reduced post-thaw morphological damage. However, no improvement in hatching rate was observed with cysteine supplementation. In the second chapter, the effect of taurine as an antioxidant in the cryoprotective medium was evaluated at concentrations of 1, 2, and 4 mM. Although no significant differences were found in kinetic parameters among treatments, 1 and 2 mM taurine increased membrane integrity. The 2 mM concentration also resulted in a higher percentage of morphologically normal spermatozoa and a lower incidence of primary and secondary defects. Overall, the results of this thesis contribute to refining cryopreservation techniques in fish, demonstrating the potential of antioxidant supplementation for maintaining the post-thaw sperm quality of *P. corruscans*. The knowledge generated is relevant to conservation programs, assisted reproduction, and the establishment of germplasm banks for the preservation of endangered native species.

**Keywords:** antioxidant, catfish, pintado, siluriform, semen, cryopreservation

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1. Solução APS (A) e Solução AE (B) no meio diluído de glicose 5,5% e metanol 10% após a descongelamento.....39

Figura 2. Integridade da membrana (%) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservados em meio contendo diferentes concentrações de cisteína (0, 1, 2 e 4 mM) após o descongelamento.....44

Figura 3. Taxa de eclosão de larvas provenientes de oócitos fertilizados com sêmen criopreservado (com alta aglutinação) de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) .....46

Figura 4. Taxa de eclosão de larvas provenientes de oócitos fertilizados com sêmen criopreservado (com baixa aglutinação) de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) .....46

### Capítulo II

Figura 1. Integridade de membrana (%) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservados em meio contendo diferentes concentrações de taurina (0, 1, 2 e 4 mM) após o descongelamento.....73

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

- Tabela 1. Parâmetros de cinética espermática do sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 3) criopreservado com metanol, após descongelamento (36°C/8”), com diferentes ativadores e em diferentes tempos pós-ativação (10, 20, 30, 40, 50 e 60 s) .....38
- Tabela 2. Morfologia (%) e Integridade de Membrana (%) (n = 3) espermática de *Pseudoplatystoma corruscans* fresco e criopreservados em meio diluente com metanol (10%) .....38
- Tabela 2. Motilidade total (MT, %) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5), criopreservados em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl, em diferentes tempos pós-ativação.....40
- Tabela 3. Motilidade progressiva (MP, %) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5), criopreservado em meio contendo 0, 1, 2 ou 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....40
- Tabela 4. Análise do percentual de espermatozoides rápidos (ER, %) no sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservado em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....41
- Tabela 5. Análise do percentual de espermatozoides médios (EM, %) no sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservado em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....42
- Tabela 6. Análise do percentual de espermatozoides lentos (EL, %) no sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservados em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....42
- Tabela 7. Velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservados em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....43
- Tabela 8. Velocidade linear (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservados em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....43
- Tabela 10. Velocidade média (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservados em meio contendo 0, 1, 2 e 4 mM de cisteína e ativados com água destilada ou solução de NaCl em diferentes tempos pós-ativação.....44
- Tabela 11. Morfologia espermática (%) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* (n = 5) criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína (0, 1, 2 e 4 mM) após o descongelamento.....45

## Capítulo II

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* criopreservado e suplementados com diferentes concentrações de taurina (0, 1, 2 e 4 mM) .....72

Tabela 2. Morfologia espermática (%) dos espermatozoides de *Pseudoplatystoma corruscans* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de taurina (0, 1, 2 e 4 mM) após o descongelamento.....74

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>24</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>61</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>66</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O *Pseudoplatystoma corruscans*, popularmente conhecido como pintado, é uma espécie nativa cuja distribuição abrange as bacias do Paraná e do São Francisco (Pereira et al., 2023). É uma espécie migratória que percorre grandes distâncias para a reprodução (Melo-Silva et al., 2022), possui hábitos noturnos e é carnívora (Santos et al., 2012). Seu ciclo reprodutivo é sazonal e está ligado aos níveis fluviométricos (Agostinho et al., 2007), em que o desencadeamento metabólico da desova depende de fatores ambientais, principalmente, chuva, temperatura e fotoperíodo (Baldisserotto et al., 2014). Altamente valorizado na pesca esportiva e comercial pelo seu grande tamanho e sabor suave (Balboni et al., 2021; Mikkola, 2024), o *P. corruscans* é também muito utilizado na produção de peixes híbridos (Hashimoto et al., 2012).

Essa espécie foi recentemente incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção no Brasil, sendo classificada como vulnerável (Brasil, 2022). Apesar dessa classificação, a pesca é permitida, desde que sejam seguidas as normas estabelecidas para garantir a conservação da espécie e a sustentabilidade da atividade pesqueira (Brasil, 2024). Devido a sua importância econômica e ecológica, é essencial conduzir pesquisas que investiguem métodos de reprodução assistida. A criopreservação surge como uma solução promissora, especialmente considerando que a espécie é migratória. Uma das vantagens dessa técnica é a sincronização da disponibilidade de gametas (Cabrita et al., 2010). A criopreservação consiste em manter o material biológico em estágio latente em nitrogênio líquido, por tempo indeterminado, reduzindo a necessidade da manutenção de um grande estoque reprodutor, facilitando o transporte dos gametas e possibilitando organização do uso destes (Suquet et al., 2000; Cabrita et al., 2010).

Para que ocorra a criopreservação espermática adequada, uma série de etapas devem ser seguidas após a escolha do reprodutor. Essas etapas incluem a indução hormonal, a coleta e avaliação da qualidade seminal, a diluição em uma solução crioprotetora, o envasamento, a congelamento e o armazenamento em local apropriado. A verificação da eficácia do processo de criopreservação se dá após o descongelamento, com a reavaliação da qualidade do sêmen, e verificação da capacidade fertilizante dos espermatozoides, pela fertilização dos oócitos e a avaliação da eclosão das larvas (Maria; Carneiro, 2012).

Inúmeras variáveis podem influenciar a capacidade de fertilização dos espermatozoides criopreservados. Entre essas variáveis estão os diluentes, a taxa de diluição, os crioprotetores e suas concentrações, a velocidade e o método de congelação, a temperatura de descongelamento, a qualidade do esperma e do oócito e, a razão espermatozoide/oócito (Gwo, 2011). Estabelecer um protocolo de criopreservação é um desafio, pois os parâmetros citados podem interagir entre si, influenciando o desenvolvimento do protocolo (Suquet et al., 2000). As diferentes espécies de peixes apresentam sensibilidade diferentes aos níveis de diluição e às substâncias empregadas na criopreservação espermática (Magnotti et al., 2018). Portanto, é necessário desenvolver um protocolo específico de criopreservação para cada espécie.

Diversos tipos de crioprotetores têm sido utilizados na criopreservação espermática de espécies de peixes, como dimetilsulfóxido (Ninhaus-Silveira et al., 2006; *Brycon cephalus*), dimetilacetamida (Velarde et al., 2023; *P. corruscans*), metanol (Carolsfeld et al., 2003; *P. corruscans*), metilglicol (Viveiros et al., 2012; *Brycon nattereri*), dimetilformamida (Perry et al., 2019; *Brycon orbignyanus*), glicerol (Bozkurt et al., 2019; *Oreochromis niloticus*) propilenoglicol (Yusoff et al., 2018; *Epinephelus fuscoguttatus*) e etilenoglicol (Atencio-García et al., 2014; *Sorubim cuspicaudus*), todos apresentando resultados promissores. Embora esses compostos sejam essenciais para uma criopreservação bem-sucedida, podem ser tóxicos em concentrações inadequadas (Cloud; Patton, 2008).

O dimetilsulfóxido é o agente crioprotetor mais utilizado no processo de criopreservação espermática de peixes de água doce. No entanto, o metanol é o mais utilizado em protocolos com bagres sul-americanos (Streit Jr et al., 2023). As pesquisas sobre a criopreservação espermática de *P. corruscans* são escassas, sendo Carolsfeld et al. (2003) e Velarde et al. (2023) os únicos estudos disponíveis sobre a criopreservação espermática de *P. corruscans*. O uso de dimetilsulfóxido a 10%, associado à glicose, não se mostrou tão eficaz quanto o metanol a 10%, associado à glicose e ao leite em pó (Carolsfeld et al., 2003). E não houve diferenças entre o uso de dimetilsulfóxido ou dimetilacetamida, embora a dimetilacetamida tenha apresentado menores danos ao DNA (Velarde et al., 2023).

O processo de criopreservação dos espermatozoides pode afetar a função mitocondrial e aumentar o estresse oxidativo (Figuerola et al., 2019), além de causar danos a membrana plasmática (Cabrita et al., 2010) e, danos morfológicos (Velarde et al., 2023)

devido à formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares (Figuerola et al., 2019). Normalmente, a motilidade espermática dos espermatozoides criopreservados, após o descongelamento, é reduzida, em comparação com os do sêmen fresco (Figuerola et al., 2017). E a maior parte dos danos durante a criopreservação ocorre nas etapas de congelamento e descongelamento (Andreev et al., 2009). Um desses danos é a aglutinação seminal pós-descongelamento, que foi observada em alguns casos de criopreservação de espermatozoides de peixes (Várkonyi et al., 2019) e ostras (Dong et al., 2007). Esse fenômeno não teve uma causa específica determinada, mas foi relacionada à composição dos extensores, ao tipo de crioprotetores e as condições de resfriamento (Irawan et al., 2010).

Para melhorar a proteção celular contra os efeitos da congelamento e do descongelamento, diversas substâncias, como os antioxidantes, podem ser adicionadas à solução crioprotetora (Magnotti et al., 2018; Torres et al., 2024), como também, podem ser incorporados na ração dos peixes (Sarmiento et al., 2017; Sarih et al., 2019). Os antioxidantes protegem as células dos processos de oxidação e dos radicais livres (Muthmainnah et al., 2018).

Estudos diversos têm investigado a aplicação de antioxidantes como suplementação em soluções crioprotetoras utilizadas na diluição do sêmen. Entre os antioxidantes estudados estão a melatonina (Yang et al., 2023), o ácido úrico (Polat; Kurtoğlu, 2023), o  $\alpha$ -tocoferol (Figuerola et al., 2018), o ácido ascórbico (Almeida-Monteiro et al., 2017), a taurina (Lopes et al., 2018) e a cisteína (Öğretmen et al., 2015). Além disso, compostos como glutathione, superóxido redutase e catalase também foram testados (Shaliutina-Kolešová et al., 2015; Li et al., 2018).

A suplementação das soluções diluidoras com antioxidantes propõe aumentar o poder antioxidante dos diluentes, reduzindo o nível de espécies reativas de oxigênio e melhorando a qualidade do sêmen descongelado (Lopes et al., 2016). As espécies reativas de oxigênio são produzidas pelo metabolismo aeróbio celular e, seu excesso, pode levar ao estresse oxidativo, promovendo várias alterações patológicas, incluindo lesões na membrana plasmática e no DNA, redução da motilidade e da viabilidade espermática e, à diminuição da capacidade fertilizante do sêmen (Ball, 2008; Słowińska et al., 2013).

A suplementação do meio de congelamento com ácido úrico, metionina, carnitina,  $\alpha$ -tocoferol e glutathione pode aumentar a taxa de motilidade e a duração pós-

descongelamento de espermatozoides de *Oncorhynchus mykiss* (Kutluyer et al., 2014). Já a adição de melatonina resultou em maior percentual de espermatozoides rápidos em *Prochilodus brevis* com maiores velocidades espermáticas (Torres et al., 2024). E a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico reduz a lipoperoxidação da membrana e a produção de superóxido, aumentando assim a capacidade de fertilização dos espermatozoides do *Salmo salar* (Figuerola et al., 2018). A cisteína melhorou o potencial de fertilidade dos espermatozoides de *E. fuscoguttatus* após o descongelamento (Yang et al., 2023).

A cisteína, um aminoácido natural contendo enxofre, atua como um precursor crucial da glutatona, um antioxidante essencial que protege as células contra os radicais livres (Piste et al., 2013; Öğretmen et al., 2015). É amplamente utilizada em soluções de congelamento para espermatozoides de diversas espécies de animais. Em bovinos, demonstrou melhorar a integridade do DNA (Tuncer et al., 2010) e a motilidade pós-descongelamento (Sariözkan et al., 2009). Em javalis, contribuiu para a viabilidade e a integridade do acrossoma (Malo et al., 2010). Já em carneiros, reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio (Kafi et al., 2024). A aplicação de cisteína nas soluções crioprotetoras de espermatozoide foi relatada por Sarosiek et al. (2014) em *Perca fluviatilis*; Liu et al. (2015) em *Pagrus major*; Öğretmen et al. (2015) em *Cyprinus carpio*; Li et al. (2018) em *Acipenser dabryanus* e *Acipenser baerii*; Lopes et al. (2018) em *Colossoma macropomum*; Da Costa et al. (2020, 2021) em *Rhamdia quelen*; Yang et al. (2023) em *E. fuscoguttatus* e Torres et al. (2024) em *P. brevis*. Em geral, a adição de cisteína melhora os parâmetros cinéticos dos espermatozoides pós-descongelamento e a taxa de fertilização (Öğretmen et al., 2015; Yang et al., 2023). No entanto, a aplicação de cisteína na criopreservação espermática de *P. corruscans* ainda não foi conduzida.

A taurina é um antioxidante amplamente utilizado para melhorar a qualidade seminal após o processo de criopreservação. Este aminoácido contendo enxofre participa de diversas atividades biológicas e fisiológicas (Rais et al., 2023) e desempenha um papel importante na redução das espécies reativas de oxigênio (Cabrita et al., 2011). Além disso, a taurina é considerada um aminoácido essencial que funciona como estabilizador de membranas, interagindo diretamente com fosfolípidios (Schaffer et al., 2010). A incorporação de taurina na composição da solução crioprotetora tem sido testada em várias espécies de peixes, incluindo *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *O. mykiss*, *C. carpio*, *P. major*, *Carassius auratus*, *Epinephelus marginatus*, *C. macropomum*,

*Scophthalmus maximus* e *P. brevis* (Cabrita et al., 2011; Ekici et al., 2012; Martínez-Páramo et al., 2013; Yavaş et al., 2014; Liu et al., 2015; Kutluyer et al., 2016; Riesco et al., 2017; Lopes et al., 2018; Polat; Kurtoğlu, 2023; Torres et al., 2024). Esta suplementação proporcionou resultados satisfatórios, incluindo melhorias na integridade do DNA dos espermatozoides (Cabrita et al., 2011), aumento da motilidade espermática (Martínez-Páramo et al., 2013), aprimoramento da função mitocondrial (Liu et al., 2015), elevação das taxas de fertilização e eclosão (Yavaş et al., 2014), além de melhorar as velocidades espermática após o descongelamento (Lopes et al., 2018). No entanto, em alguns casos, não houve melhora na qualidade seminal após o descongelamento (Torres et al., 2024), já que o efeito de cada antioxidante é específico para cada espécie (Cabrita et al., 2011). Até o momento, a aplicação de taurina na criopreservação espermática de *P. corruscans* ainda não foi realizada.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo eficaz para a criopreservação dos espermatozoides de *P. corruscans*, determinando a solução crioprotetora mais adequada e avaliando o uso de antioxidantes, como a taurina e a cisteína, com o objetivo de manter a qualidade das células espermáticas pós-descongelamento. Além de analisar a qualidade do sêmen ativado usando diferentes soluções ativadoras na motilidade espermática após o descongelamento.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar o crioprotetor mais adequado para a espécie em estudo;
- Avaliar o efeito da adição de cisteína na solução crioprotetora, visando manter a qualidade espermática após o descongelamento;
- Avaliar a taxa de eclosão dos embriões fecundados com sêmen descongelado de *P. corruscans* como um indicativo de qualidade e preservação das características seminais;
- Definir a solução ativadora adequada para o sêmen após o descongelamento;
- Avaliar a influência da suplementação de taurina na solução crioprotetora sobre as características espermática da espécie;
- Investigar as possíveis alterações morfológicas nos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; PETRY, A. C.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 10, n. 2, p. 174-186, 2007.

ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; PINHEIRO, R. R. R.; LOPES, J. T.; FERREIRA, Y. M.; MONTENEGRO, A. R.; MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2669-2679, 2017.

ANDREEV, A. A.; SADIKOVA, D. G.; GAKHOVA, E. N.; PASHOVKIN, T. N.; TIKHOMIROV, A. M. Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. **Biophysics**, v. 54, n. 5, p. 612-616, 2009.

ATENCIO-GARCÍA, V. J.; DORADO, M.; NAVARRO, E.; PÉREZ, F.; HERRERA, B.; MOVILLA, J.; ESPINOSA-ARAUJO, J. A. Evaluación de etilenglicol como crioprotector en la crioconservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae). **Acta Biológica Colombiana**, v. 19, n. 2, p. 271-280, 2014.

BALBONI, L.; VARGAS, F.; COLAUTTI, D. Age and growth of *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) at the confluence of the Paraná and Paraguay rivers. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 2, p. e200101, 2021.

BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Ed. Funep, Jaboticabal. p.336. 2014.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 257-267, 2008.

BOZKURT, Y.; YAVAŞ, İ.; BUCAK, M. N.; YENI, D. Effect of different cryoprotectants (Glycerol, Methanol and Dimethyl Sulfoxide) on post-thaw quality, viability, fertilization ability and DNA damage of cryopreserved Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatozoa. **CryoLetters**, v. 40, n. 1, p. 11-17, 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Reconhece espécies da fauna silvestre brasileira ameaçadas de extinção e estabelece

medidas de proteção. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 8 jun. 2022. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>. Acesso em: 20 maio 2024.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura; Ministério do Meio Ambiente. Portaria Interministerial MPA/MMA nº 15, de 6 de dezembro de 2024. Estabelece medidas de ordenamento para a pesca do pintado ou surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 6 dez. 2024. Disponível em <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=515&pagina=125&data=12/12/2024&captchafield=firstAccess>. Acesso em: 7 jan. 2025.

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

CABRITA, E.; MA, S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.; DINIS, M. T. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 189-195, 2011.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E. A. N. D.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.

CLOUD, J.; PATTON, S. Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. In: **Methods in Reproductive Aquaculture**. CRC Press. p. 259-272, 2008.

DA COSTA, B. B.; MARQUES, L. S.; LASSEN, P. G.; RODRIGUES, R. B.; SILVA, H. T. R.; MOREIRA, J. C. F.; STREIT, D. P. Effects of cysteine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 2, p. 455-464, 2020.

DA COSTA, B. B.; MARQUES, L. S.; LASSEN, P. G.; RODRIGUES, R. B.; DA ROSA-SILVA, H. T., MOREIRA, J. C. F.; OLIVEIRA, D. L.; STREIT JR, D. P. Effect of glutamine and cysteine supplementation on quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 2173-2181, 2021.

DONG, Q.; HUANG, C.; TIERSCH, T. R. Control of sperm concentration is necessary for standardization of sperm cryopreservation in aquatic species: evidence from sperm agglutination in oysters. **Cryobiology**, v. 54, n. 1, p. 87-98, 2007.

EKICI, A.; BARAN, A.; YAMANER, G.; ÖZDAŞ, Ö. B.; SANDAL, A. İ.; GÜVEN, E.; BALTACI, M. A. Effects of different doses of taurine in the glucose-based extender during cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 4, p. 3113-3115, 2012.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; ZEPEDA, A. B.; FIGUEROA, C. A.; DUMORNÉ, K.; CASTILLO, R. L.; FARIAS, J. G. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 1, p. 76-87, 2017.

FIGUEROA, E.; FARIAS, J. G.; LEE-ESTEVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; RISOPATRÓN, J.; MAGNOTTI, C.; ROMERO, J.; WATANABE, I.; OLIVEIRA, R. P. D. S. Sperm cryopreservation with supplementation of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 493, p. 1-8, 2018.

FIGUEROA, E.; LEE-ESTEVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; WATANABE, I.; OLIVEIRA, R. P. D. S.; ROMERO, J.; CASTILLO, R. L.; FARIAS, J. G. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. **Aquaculture**, v. 511, p. 634190, 2019.

GWO, J.C. Cryopreservation in aquatic species. **Baton Rouge: World Aquaculture Society**, p.138-160, 2011.

HASHIMOTO, D. T.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, n. 2, p. 108-118, 2012.

IRAWAN, H.; VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 236-243, 2010.

KAFI, A.; KHALID, M.; HERATH, T.; KERSHAW, C. Cysteine supplementation pre-freeze and post-thaw improves integrity and reduces oxidative stress in cryopreserved ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 114, p. 104854, 2024.

KUTLUYER, F.; KAYIM, M.; ÖĞRETMEN, F.; BÜYÜKLEBLEBİCİ, S.; TUNCER, P. B. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 462-466, 2014.

KUTLUYER, F.; ÖĞRETMEN, F.; INANAN, B. E. Cryopreservation of goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage. **CryoLetters**, v. 37, n. 1, p. 41-46, 2016.

LI, P.; XI, M. D.; DU, H.; QIAO, X. M.; LIU, Z. G.; WEI, Q. W. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 2, p. 287-295, 2018.

LIU, Q.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, X.; XU, S.; MA, D.; XIAO, Z.; XIAO, Y.; LI, J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 413-422, 2015.

LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S. D. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelamento seminal. **R. bras. Reprod. Anim.**, v. 40, n. 1, p. 29-34, 2016.

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

MAGNOTTI, C.; CERQUEIRA, V.; LEE-ESTEVEZ, M.; FARIAS, J. G.; VALDEBENITO, I.; FIGUEROA, E. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 15-25, 2018.

MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; MARTÍNEZ, F.; CANO, R.; DE BLAS, I.; ESPINOSA, E. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 142-147, 2010.

MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Fish semen cryopreservation in Brazil: state of the art and future perspectives. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; SOARES, F.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 66, n. 3, p. 333-338, 2013.

MELO-SILVA, M.; DA SILVA, J. C.; BIALETZKI, A. Community structure of fish larvae in different biotopes of a neotropical river. **Community Ecology**, v. 23, n. 1, p. 1-12, 2022.

MIKKOLA, H. Aquaculture and Fisheries as a Food Source in the Amazon Region-A Review. **Food Nutr J**, v. 9, p. 286, 2024.

MUTHMAINNAH, C. R.; ERIANI, K.; HASRI, I.; IRHAM, M.; BATUBARA, A. S.; MUCHLISIN, Z. A. Effect of glutathione on sperm quality after short-term cryopreservation in seukuran fish *Osteochilus vittatus* (Cyprinidae). **Theriogenology**, v. 122, p. 30-34, 2018.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A.; ALEXANDRE, J. S.; CHAGURI, M. P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 19, p. 1-8, 2006.

ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B. E.; KUTLUYER, F.; KAYIM, M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1548-1552, 2015.

PEREIRA, L. A.; CASTELLO, L.; ORTH, D. J.; DUPONCHELLE, F.; HALLERMAN, E. M. A Synthesis of the Ecology and Conservation of *Pseudoplatystoma* Catfishes in the Neotropics. **Fishes**, v. 8, n. 6, p. 306, 2023.

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

PISTE, P. Cysteine-master antioxidant. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 143-149, 2013.

POLAT, H.; KURTOĞLU, İ. Effect of Antioxidants on Cryopreserved Turbot (*Scophthalmus maximus*) Spermatozoa Quality and DNA Damage. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 23, n. 4, 2023.

RAIS, N.; VED, A.; SHADAB, M.; AHMAD, R.; SHAHID, M. Taurine, a non-proteinous essential amino acid for human body systems: an overview. **Arab Gulf Journal of Scientific Research**, v. 41, n. 1, p. 48-66, 2023.

RIESCO, M. F.; RAPOSO, C.; ENGROLA, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; MIRA, S.; CUNHA, M. E.; CABRITA, E. Improvement of the cryopreservation protocols for the dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. **Aquaculture**, v. 470, p. 207-213, 2017.

SANTOS, A. F.; ALCARAZ, C.; SANTOS, L. N.; HAYASHI, C.; GARCÍA-BERTHO, E. Experimental assessment of the effects of a Neotropical nocturnal piscivore on juvenile native and invasive fishes. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 167-176, 2012.

SARIH, S.; DJELLATA, A.; ROO, J.; HERNÁNDEZ-CRUZ, C. M.; FONTANILLAS, R.; ROSENLUND, G.; IZQUIERDO, M.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. Effects of increased protein, histidine and taurine dietary levels on egg quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso, 1810). **Aquaculture**, v. 499, p. 72-79, 2019.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; ULUTAŞ, P. A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 134-138, 2009.

SARMENTO, N. L. A. F.; MARTINS, E. F. F.; COSTA, D. C.; SILVA, W. S.; MATTIOLI, C. C.; LUZ, M. R.; LUZ, R. K. Effects of supplemental dietary vitamin C on quality of semen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeders. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 1, p. 144-152, 2017.

SAROSIEK, B.; DRYL, K.; KUCHARCZYK, D.; ŻARSKI, D.; KOWALSKI, R. K. Motility parameters of perch spermatozoa (*Perca fluviatilis* L.) during short-term storage with antioxidants addition. **Aquaculture International**, v. 22, p. 159-165, 2014.

SCHAFFER, S. W.; JU JONG, C.; KC, R.; AZUMA, J. Physiological roles of taurine in heart and muscle. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, p. 1-8, 2010.

SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A.; COSSON, J.; LEBEDA, I.; GAZO, I.; SHALIUTINA, O.; DZYUBA, B.; LINHART, O. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 66-76, 2015.

SŁOWIŃSKA, M.; NYNCA, J.; CEJKO B. I.; DIETRICH, M. A.; HORVÁTH, Á.; URBÁNYI, B.; KOTRIK, L.; CIERESZKO, A. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. **Aquaculture**, v. 400, p.101-104, 2013.

STREIT, D. P.; RODRIGUES, R. B.; SANCHES, E. A.; POVH, J. A.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DE FREITAS, T. R.; SANTOS, N. T.; LISBOA, J. B.; FRANÇA, T. S.; NICOLETI, E.; LIMA, L. O. C.; ZHANG, T. Protocols for the seminal cryopreservation of South American catfishes-current status. **Cryobiology**, v. 113, p. 104703, 2023.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research: Original Articles**, v. 31, n. 3, p. 231-243, 2000.

TORRES, T. M.; DE ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; DO NASCIMENTO, R. V.; CÂNDIDO-SOBRINHO, S. A.; SOUSA, C. T. N.; FERREIRA, Y. M.; DE PAULA, K. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Effects of taurine, cysteine and melatonin as antioxidant supplements to the freezing medium of *Prochilodus brevis* sperm. **Cryobiology**, v. 114, p. 104858, 2024.

TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; SARIÖZKAN, S.; YENI, D.; EKEN, A.; AKALIN, P. P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. F.; GÜNDOĞAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 303-307, 2010.

VÁRKONYI, L.; BOKOR, Z.; MOLNÁR, J.; FODOR, F.; SZÁRI, Z.; FERINCZ, Á.; STASZNY, Á.; LÁNG, L. Z.; CSORBAI, B.; URBÁNYI, B.; BERNÁTH, G. The comparison of two different extenders for the improvement of large-scale sperm cryopreservation in common carp (*Cyprinus carpio*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 639-645, 2019.

VELARDE, J. M. C.; BASTOS, N. M.; CARNEIRO-LEITE, L.; BORGES, L. P.; VIEIRA, E. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Dimethyl acetamide and dimethyl sulfoxide associated at glucose and egg yolk for cryopreservation of *Pseudoplatystoma corruscans* semen. **Neotropical Ichthyology**, v. 21, n. 1, p. e220071, 2023.

VIVEIROS, A. T.; MARIA, A. N.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 4, p. 546-555, 2012.

YANG, S.; FAN, B.; CHEN, X.; MENG, Z. Effects of supplementation of cryopreservation media with cysteine on the post-thaw quality and fertility of brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 210, p. 62-67, 2023.

YAVAŞ, I.; BOZKURT, Y.; YILDIZ, C. Effect of different antioxidants on motility, viability and fertilizing capacity of cryopreserved scaly carp (*Cyprinus carpio*) semen. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, v. 66, p. 1-6, 2014.

YUSOFF, M.; HASSAN, B. N.; IKHWANUDDIN, M.; SHERIFF, S. M.; HASHIM, F.; MUSTAFA, S.; KOH, I. C. C. Successful sperm cryopreservation of the brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* using propylene glycol as cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 81, p. 168-173, 2018.