

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS
PARA CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA
DE *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* E
UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DO HÍBRIDO
TAMBACU**

Ana Regina Seabra de Souza

Jaboticabal, São Paulo

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS
PARA CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA
DE *PIARACTUS MESOPOTAMICUS* E
UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DO HÍBRIDO
TAMBACU**

Ana Regina Seabra de Souza

Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Jaboticabal, São Paulo

2026

S729

Souza, Ana Regina Seabra de

Estabelecimento de protocolos para criopreservação
espermática de *Piaractus mesopotamicus* e utilização na
produção do híbrido tambacu / Ana Regina Seabra de Souza.
-- Jaboticabal, 2026

77 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal
Orientador: Eduardo Antônio Sanches

1. Aquicultura. 2. Criopreservação espermática. 3.
Reprodução. 4. Espécie nativa. 5. Fertilidade. I. Título.

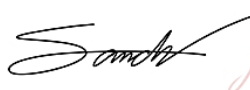
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estabelecimento de protocolos para criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus* e utilização na produção do híbrido tambacu

AUTORA: ANA REGINA SEABRA DE SOUZA

ORIENTADOR: EDUARDO ANTÔNIO SANCHES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área de Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Assinado de forma digital por
EDUARDO ANTONIO
SANCHES:05482916910
Dados: 2026.03.05 07:29:00 -03'00'

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / UNESP / Câmpus de Registro - FCAVR



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA
Data: 03/03/2026 08:31:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / UNESP / Câmpus de Ilha Solteira - FEIS



Documento assinado digitalmente
DANILO PEDRO STREIT JR
Data: 03/03/2026 09:55:01-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Professor Adjunto DANILO PEDRO STREIT JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE NIZIO MARIA
Data: 03/03/2026 09:06:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. ALEXANDRE NIZIO MARIA (Participação Virtual)
Embrapa Tabuleiros Costeiros / Aracaju/Sergipe



Documento assinado digitalmente
RAFAEL VILHENA REIS NETO
Data: 04/03/2026 10:59:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. RAFAEL VILHENA REIS NETO (Participação Virtual)
Diretoria / UNESP / Câmpus de Registro - FCAVR

, 02 de março de 2026.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Índices de integridade de membrana obtidas dos tratamentos com espermatozoide criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> , comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção.	26
Figura 2. Taxas de motilidade (MOT) obtidas dos tratamentos com espermatozoide criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> , comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção.	27
Figura 3. Taxas de velocidade curvilínea (VCL) obtidas dos tratamentos com espermatozoide criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> , comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção.	28
Figura 4. Taxas de velocidade média de deslocamento (VAP) obtidas dos tratamentos com espermatozoide criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> , comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção.	29
Figura 5. Taxas de velocidade em linha reta (VSL) obtidas dos tratamentos com espermatozoide criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> , comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção.	30

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema resumido da metodologia empregada durante o processo de criopreservação espermática de <i>P. mesopotamicus</i>	45
Figura 2. Parâmetros cinéticos de (A): taxas de motilidade (MOT); (B): Velocidade curvilínea (VCL); (C): Velocidade média de deslocamento (VAP) e (D): Velocidade em linha reta (VSL) obtidos por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoide criopreservado de três “pools” (blocos) de sêmen de <i>P. mesopotamicus</i> , sendo os diferentes métodos de congelamento considerados como tratamentos e o sêmen fresco como controle.	49
Figura 3. Percentual de alterações morfológicas espermáticas obtidas de três “pools” de sêmen criopreservados de <i>P. mesopotamicus</i> utilizando diferentes métodos de congelamento (tratamentos). (A): normal; (B): cauda dobrada; (C): cauda quebrada/fraturada; (D): gota citoplasmática; (E): cabeça solta e (F): cauda solta.	51
Figura 4. Taxas de fertilização (A), eclosão (B) e larvas normais (C) obtidas a partir de três “pools” de sêmen criopreservados de <i>P. mesopotamicus</i> , sendo os diferentes métodos de congelamento considerados como tratamentos e o sêmen fresco como controle.	52

CAPÍTULO III

Figura 1. Parâmetros de (A) Motilidade; (B) Velocidade Curvilínea; (C) Velocidade média da trajetória (VAP); (D) Velocidade linear progressiva, obtidos por meio do software livre ImageJ/plugin CASA em 5 segundos pós-ativação, para do sêmen criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> com três diferentes “pools”, em comparação ao sêmen fresco.	69
Figura 2. Parâmetros de alterações morfológicas do sêmen criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> com três diferentes “pools”, em comparação ao sêmen fresco classificados em (A) Normal; (B) Cauda dobrada; (C) Gota citoplasmática; (D) Cabeça solta; (E) Cauda solta e (F) Cauda curta.	70
Figura 3. Taxa de fertilização (A), eclosão (B) e larvas normais (C) do sêmen criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> com três diferentes “pools”, em comparação ao sêmen fresco aplicando-se teste t-student.	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Tratamentos aplicados para criopreservação espermática de <i>P. mesopotamicus</i>	22
Tabela 2. Parâmetros do sêmen fresco (n=8) de <i>P. mesopotamicus</i>	24
Tabela 3. Resultados dos parâmetros de alterações morfológicas (média $\pm$ desvio padrão) referentes aos tratamentos criopreservados com duas diferentes soluções diluidoras e três proporções para o sêmen de <i>P. mesopotamicus</i>	25

CAPÍTULO II

Tabela 1. Tratamentos aplicados para criopreservação espermática de pacu, <i>P. mesopotamicus</i>	43
Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros do sêmen fresco (pools) de <i>P. mesopotamicus</i> em 5 segundos pós-ativação	48

CAPÍTULO III

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros do sêmen fresco (pools) de <i>P. mesopotamicus</i> em 5 segundos pós-ativação	68
---	----

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xi
APOIO FINANCEIRO.....	xi
RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT.....	9
PREÂMBULO.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
OBJETIVO GERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
CAPÍTULO I – Artigo.....	17
Criopreservação espermática de <i>Piaractus mesopotamicus</i> utilizando diferentes soluções diluidoras*	Erro!
Indicador não definido.	
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1. Introdução.....	19
2. Material e métodos.....	20
2.1. Seleção de reprodutores.....	20
2.2. Indução hormonal e coleta dos gametas.....	21
2.3. Delineamento experimental.....	21
2.4. Criopreservação.....	22
2.5. Análises espermáticas.....	22
2.6. Análise estatística.....	23
3. Resultados.....	24
4. Discussão.....	30
5. Conclusão.....	33
Referências.....	34
CAPÍTULO II – Artigo.....	38
Criopreservação espermática de <i>Piaractus mesopotamicus</i> utilizando diferentes métodos de congelamento submetidos a diferentes temperaturas*	Erro! Indicador não definido.
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e Métodos.....	41
2.1. Seleção dos reprodutores.....	41
2.2. Indução hormonal e coleta de gametas.....	42
2.3. Delineamento experimental.....	42
2.4. Criopreservação espermática.....	43
2.5. Análise espermática.....	45
2.6. Capacidade fecundante.....	46
2.7. Análise estatística.....	47
3. Resultados.....	47
3.1. Cinética espermática.....	48
3.2. Alterações morfológicas.....	49
3.3. Capacidade fecundante.....	52
4. Discussão.....	53
5. Conclusão.....	56
Referências.....	56
CAPÍTULO III – Artigo.....	61
É possível produzir híbrido tambacu (<i>Colossoma macropomum</i> x <i>Piaractus mesopotamicus</i>) utilizando sêmen criopreservado de <i>P. mesopotamicus</i> ?.....	61
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
1. Introdução.....	63
2. Material e Métodos.....	64
2.1. Seleção dos reprodutores.....	64
2.2. Indução hormonal e coleta de gametas.....	64
2.3. Criopreservação espermática.....	65
2.4. Análise de fertilidade.....	66
2.5. Análise estatística.....	67
3. Resultados.....	67
4. Discussão.....	71
5. Conclusão.....	73
Referências.....	74

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu mais profundo e sincero agradecimento. Vocês foram a base de tudo, oferecendo apoio incondicional, compreensão e amor em todos os momentos desta jornada. Cada palavra de incentivo, cada gesto de cuidado e cada sacrifício feito por vocês foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui. Ao meu filho Pedro, minha maior motivação e razão de seguir em frente. Obrigada por iluminar meus dias e me dar forças nos momentos mais difíceis.

Ao meu professor orientador Dr. Eduardo Antônio Sanches pela orientação, dedicação e confiança ao longo de todo o desenvolvimento desta pesquisa. Sua experiência, paciência e ensinamentos foram fundamentais para a construção deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e profissional.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Polo Regional do Vale do Ribeira (APTA) por intermédio da Camila Fernandes Corrêa pelo fornecimento dos exemplares necessários para execução deste trabalho.

Ao grupo de estudos do laboratório de Aquicultura da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP pelo apoio e contribuição que foram essenciais para a construção desse trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira – UNESP pela disponibilização da infraestrutura, dos espaços e dos recursos materiais necessários para a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) pela formação oferecida, pelo suporte acadêmico e pelas oportunidades que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Processo nº 88887.486388/2020-00 pela concessão da bolsa.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
CAPES – Processo nº 88887.715732/2022-00

APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Polo Regional do Vale do Ribeira, pelo fornecimento das matrizes.

RESUMO GERAL

Apesar de a criopreservação ser uma biotecnologia destinada à preservação do material genético de peixes, essa prática ainda não se encontra consolidada para *Piaractus mesopotamicus*, espécie que até o momento não dispõe de um protocolo aplicável ao setor produtivo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*, utilizando diferentes soluções diluidoras e métodos de congelamento. O estudo foi conduzido em três etapas, resultando em três experimentos distintos relacionados ao processo de criopreservação espermática da espécie, avaliando: (i) diferentes soluções diluidoras; (ii) diferentes métodos de congelamento submetidos a distintas temperaturas; e (iii) a possibilidade de formação do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) a partir de sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*. Como principais resultados, verificou-se que o uso da solução diluidora composta predominantemente por frutose apresentou maior eficiência na manutenção da qualidade espermática após o processo de descongelamento e que a proporção 1:3 é mais indicada e pode ser aplicada no procedimento de criopreservação utilizando tubos criogênicos de 2,0 ml em *Piaractus mesopotamicus*. Além disso, Conclui-se que, em criotubos de 2,0 mL, o congelamento em dry shipper favorece a manutenção da integridade celular e da motilidade espermática de *Piaractus mesopotamicus*, constituindo estratégia adequada para o aperfeiçoamento do protocolo de criopreservação da espécie. Como forma de validação dos métodos testados, a obtenção do híbrido demonstrou que o protocolo com uso de tubos criogênicos de 2,0 mL permite a produção satisfatória de larvas do híbrido tambacu a partir de sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*, evidenciando seu potencial de aplicação em escala comercial.

Palavras-chave: Aquicultura, espécie nativa, sêmen, congelamento

GENERAL ABSTRACT

Although cryopreservation is a biotechnology aimed at preserving the genetic material of fish, this practice is not yet well-established for *Piaractus mesopotamicus*, a species for which there is currently no protocol applicable to the production sector. In this context, the objective of this work was to develop a sperm cryopreservation protocol for *P. mesopotamicus*, using different dilution solutions and freezing methods. The study was conducted in three stages, resulting in three distinct experiments related to the sperm cryopreservation process of the species, evaluating: (i) different dilution solutions; (ii) different freezing methods subjected to extreme temperatures; and (iii) the possibility of forming the tambacu hybrid (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) from cryopreserved semen of *P. mesopotamicus*. The main results showed that the use of a diluted solution composed predominantly of fructose was more efficient in maintaining sperm quality after thawing, and that a 1:3 ratio is more suitable and can be applied in the cryopreservation procedure using 2.0 mL cryogenic tubes for *Piaractus mesopotamicus*. Furthermore, it was concluded that, in 2.0 mL cryotubes, freezing in a dry shipper favors the maintenance of cellular integrity and sperm motility in *Piaractus mesopotamicus*, constituting a suitable strategy for improving the cryopreservation protocol for this species. As a form of validation of the tested methods, the hybrid patent demonstrated that the protocol using 2.0 mL cryogenic tubes allows for the satisfactory production of tambacu hybrid larvae from cryopreserved semen of *P. mesopotamicus*, highlighting its potential for commercial-scale application.

Keywords: Aquaculture, native species, semen, freezing

PREÂMBULO

A presente tese é composta por resultados obtidos de três experimentos distintos, aos quais deram origem a três artigos, intitulados como capítulo 01: **“Criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções diluidoras”**, capítulo 02: **“Criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes métodos de congelamento submetidos a diferentes temperaturas”** e capítulo 03: **“É possível produzir híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) utilizando sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*?”**

Os resultados deste estudo serão organizados em três produtos científicos. Dois deles serão elaborados no formato de artigo científico completo, enquanto o terceiro será redigido na modalidade de *short communication*, todos estruturados conforme as normas editoriais da revista Aquaculture.

INTRODUÇÃO GERAL

A demanda pela indústria da aquicultura para fornecimento do pescado para atender o consumo mundial vem aumentando nos últimos anos e de acordo com a FAO (2024), em 2022 a aquicultura global ultrapassou a pesca de captura em volume pela primeira vez na história, alcançando um total de 130,9 milhões de toneladas, das quais 94,4 milhões são animais aquáticos, representando 51% da produção total. No Brasil, segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura, a produção estimada da piscicultura em 2024 foi de 968,7 toneladas, configurando um crescimento de 9,21% em relação ao ano anterior, sendo 258,7 toneladas representadas por peixes nativos (Peixe Br, 2025).

Dentre as espécies nativas brasileiras, o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1877) (Characiformes:Serrasalminidae) é uma espécie criada no Brasil e apresenta interesse econômico e potencial para incrementar a produção de peixes nativos na América Latina (Peixe Br, 2025; FAO 2024). Além disso, apresenta grande aceitação no mercado nacional (Vaz et al., 2000), rusticidade, boas taxas de crescimento (Jomori et al., 2005), hábito alimentar onívoro, possibilidade de obtenção de larvas através da reprodução induzida (Furuya, 2001) e fácil adaptação em cativeiro (Abimorad e Carneiro, 2004).

No entanto, o aumento da demanda por produtos pesqueiros tem tornado a piscicultura uma atividade de crescente relevância, impulsionada pelo avanço das técnicas produtivas voltadas à maximização do desempenho, ao incremento da rentabilidade e ao atendimento das exigências do mercado (Bartz et al., 2018).

Nesse contexto, o tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) destaca-se como uma espécie com potencial competitivo no setor pesqueiro, pois trata-se de uma espécie híbrida interespecífica proveniente do cruzamento da fêmea de *C. macropomum* e macho de *P. mesopotamicus* que desempenha um papel vital como uma espécie de peixe de água doce economicamente significativa no Brasil, na qual, juntamente com outro híbrido, tambatinga, ocupa a terceira posição no ranking nacional de produção de peixes (IBGE, 2025). Dada a competitividade e dinamismo do mercado aquícola nacional, esta espécie apresenta características favoráveis à sua produção como, rusticidade, taxa de crescimento superior em relação a seus parentais (Calcagnotto et al., 1999; Porto-Foresti et al., 2008; Hashimoto et al., 2012) e tolerância a baixas temperaturas, o que favorece a produção da espécie em regiões com temperaturas mais frias durante o outono e o inverno devido a duas características cruciais, o potencial de

crescimento aumentado do tabaqui e a tolerância ao frio exibida pelo pacu (Fernandes et al., 2018).

Entretanto, para que essas espécies possam ser criadas, é indispensável a disponibilidade de formas jovens em quantidade e qualidade adequadas, tornando-se por meio disso, necessárias as aplicações de tecnologias produtivas capazes de aprimorar os aspectos reprodutivos e viabilizar o transporte de material genético de elevada qualidade, como a criopreservação de gametas, uma biotecnologia passível de aplicação rotineira em laboratórios de reprodução (Viveiros e Godinho, 2009). Esta técnica consiste na manutenção da viabilidade de células ou tecidos armazenados em baixas temperaturas, conservando-se a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos, de modo que permaneçam geneticamente viáveis, sendo capazes de restabelecer a atividade metabólica após o armazenamento (Pegg, 2007).

Ainda assim, outros fatores podem interferir na capacidade fertilizante dos espermatozoides submetidos à criopreservação, tais como o tipo de diluente utilizado, a taxa de diluição, os crioprotetores e suas respectivas concentrações, a velocidade e o método de congelamento, a temperatura de descongelamento, a qualidade do sêmen e dos oócitos, bem como a proporção entre espermatozoides e oócitos (Gwo, 2011).

Estes fatores atuam em diferentes graus de sensibilidade na composição do sêmen de diferentes espécies (Magnotti et al., 2018), o que torna necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes para a criopreservação de sêmen personalizados para espécies interespecíficas.

Para o processo de criopreservação, a composição da solução crioprotetora ideal para a espécie é imprescindível, pois é um dos fatores que possibilitam que se obtenha uma criopreservação bem-sucedida. Para compor esta solução, utiliza-se uma solução diluidora, aplicada para manter um ambiente adequado para o espermatozoide e obter sucesso no desenvolvimento de protocolos de criopreservação (Viveiros e Godinho, 2009). Esta solução é representada por diferentes soluções à base de sais ou carboidratos, assim como já vistos em estudos para *P. mesopotamicus* (Streit Jr et al., 2009; Galo et al., 2019; Carvalho et al., 2014; Teodozia et al., 2020; Fogli da Silveira et al., 1990; Carolsfeld et al., 1990, 2003; Bedore, 1999), porém com resultados variáveis e baixa eficiência na qualidade.

O uso de técnicas que utilizem diferentes métodos de congelamento submetidos a diferentes temperaturas também pode ser aplicado, no intuito de minimizar os danos estruturais dos espermatozoides causados pelo processo de criopreservação de sêmen.

Quando o congelamento ocorre de forma lenta, a célula pode perder água suficiente de forma a não se congelar internamente, onde o meio ao redor das células torna-se levemente hiperosmótico, o que provoca aumento da tensão na membrana plasmática e consequentemente a desidratação celular (Mazur, 1984; Yang e Tiersch, 2009). Por outro lado, conforme a temperatura ocorre mais rapidamente, a célula começa a desidratar, momento em que cristais de gelo começam a se formar, rompendo a membrana, causando danos irreversíveis à célula (Rezende e Marques, 2009). A taxa de congelamento é um equilíbrio entre esses fatores (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Diante desses aspectos, evidencia-se a necessidade de avanços na otimização do protocolo de criopreservação, especialmente com foco em sua viabilidade e aplicação em escala comercial, garantindo maior eficiência, padronização e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Além disso, torna-se fundamental avaliar a robustez desse protocolo em contextos de cruzamento intergenérico, uma vez que esse cenário impõe desafios biológicos adicionais ao desenvolvimento embrionário, decorrentes de possíveis incompatibilidades genéticas e fisiológicas entre as espécies parentais. Nesse contexto, a compreensão integrada entre os princípios da criobiologia, a manutenção da integridade celular do sêmen após o descongelamento e o desempenho embrionário observado nos híbridos emerge como um ponto central de investigação científica. Tal articulação é essencial para compreender em que medida a preservação da qualidade espermática durante a criopreservação se traduz efetivamente em sucesso reprodutivo e viabilidade embrionária, contribuindo para o aprimoramento de biotecnologias reprodutivas aplicadas à piscicultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J., 2004. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33(5), 1101-1109. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000500001>.

BARTZ, R.L., MOREIRA, G.C., SCHMIDT, C.A.P., VINCENZI, S.L. Comparação de duas tabelas de arraçamento utilizadas no cultivo de tilápias na Região Oeste do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v.4, n.7, p.3945-3958, 2018. <https://doi.org/10.34117/bjdv4n7-426>.

BEDORE, A.G. 1999. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignianus*)**. Belo Horizonte. 53p. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG).

CALCAGNOTTO, D., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., BERNARDINO, G., TOLEDO-FILHO, S. A. 1999. Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. **Aquaculture**, v. 174, p. 51-57. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00005-8).

CAROLSFELD, J., GODINHO, H. P., ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B. J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990. Criopreservação do sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1987. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, 3(único): 1-4.

CARVALHO, A. F. S., MACHADO, M. R. F., ANDRADE, E. S., MURGAS, L. D. S., ZANGERONIMO, M. G. 2014. Effect of Caffeine Added to the Activating Solution on Sperm Motility of Fresh and Thawed Semen of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, and Curimba, *Prochilodus lineatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.45, n.1, p.75-81. <https://doi.org/10.1111/jwas.12091>.

FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in action. Rome, 264p. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A.; GODINHO, H.M.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, 17: 1-13.

FERNANDES, E.M.; DE ALMEIDA, C.F.; HASHIMOTO, D.T.; LATTANZI, G.R.; GERVÁZ, W.R.; LEONARDO, A.F.; NETO, R.V.R. 2018. Survival of purebred and hybrid Serrasalminae under low water temperature conditions. **Aquaculture**, 497, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.030>.

FURUYA, W. M. Espécies nativas. In: Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R. P. and Zimmermann, S. (Ed.). **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA. pp. 83-90. 2001.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A.; GODINHO, H.M.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, 17: 1-13.

GALO, J. M., STREIT-JUNIOR, D. P., OLIVEIRA, C. A., POVH, J. P., FORNARY, D. C., DIGMAYER, D., RIBEIRO, R. P. 2019. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, n.3, p.438-445. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.182391>.

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. 2012. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01067.x>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sidra: Banco de Tabelas Estatísticas. Tabela 3940: Produção da aquicultura. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 10 jan. 2026.

JOMORI, R. K., CARNEIRO, D. J., MARTINS, M. I., PORTELLA, M. C. 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v.243, p.175-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.034>.

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.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 247, n. 3, p. 125-142, 1984.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2ed. Totowa, NJ: **Humana Press Inc**. v.368, p.39-58, 2007.

PEIXE BR - Associação Brasileira de Piscicultura. Anuário Brasileiro da Piscicultura. São Paulo: Peixe BR. 130p. 2025.

PORTO-FORESTI, F., HASHIMOTO, D. T., ALVES, A. L., CASTILHO-ALMEIDA, R. B., SENHORINI, J. A., BORTOLOZZI, J., FORESTI, F. 2008. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid of the species Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 195-202. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200005>.

RESENDE, E. K. de.; MARQUES, D.K.S. **Criopreservação de sêmen de peixe**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAP-2010/57164/1/CT84.pdf>. Acesso em: 15 nov 2025.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B., VIEIRA, M.J.A.F., LEITE, L.V., OLIVEIRA, F.C.E., LINHARES, F.R.A., SALGUEIRO, C.C.M., NUNES, J.F. 2012. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*, 22(1), p 255-268.

STREIT JR., D. P., DE OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO, R. P., SIROL, R. N., DE MORAES, GALO, G. V., DIGMAYER, J. M. 2009. Motility, vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, p. 159-167.

TEODOZIA, E. R. P., ARAÚJO, M. S. O., LOPES, J. T., MONTENEGRO, A. R., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. 2020. Semen cryopreservation in *Piaractus mesopotamicus*: the effect of different diluents and freezing equipment. *Revista Ciência Agronômica*, v. 51, n. 2. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039>.

VAZ, M. M., TORQUATO, V. C., BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**, Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 144p. 2000.

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

YANG, H.& TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, v. 149, p. 224-232, 2009.

OBJETIVO GERAL

Otimizar o protocolo de criopreservação do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* visando sua aplicação comercial, avaliando a influência da solução diluidora, da proporção de diluição e da taxa de resfriamento sobre a qualidade espermática pós-descongelamento e sobre a eficiência reprodutiva no cruzamento intergenérico com *Colossoma macropomum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1: Avaliar o efeito de diferentes soluções diluidoras e proporções de diluição sobre a qualidade espermática pós-descongelamento de *Piaractus mesopotamicus*.
- 2: Avaliar o efeito das diferentes estratégias de resfriamento sobre a cinética e a morfologia espermática na criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus*.
- 3: Caracterizar os parâmetros espermáticos do sêmen fresco e pós-descongelamento de *Piaractus mesopotamicus*.
- 4: Avaliar os índices de fertilização, desenvolvimento embrionário e normalidade larval obtidos com sêmen criopreservado de *Piaractus mesopotamicus* no cruzamento intergenérico com *Colossoma macropomum*.

CAPÍTULO I – Artigo

Influência da composição da solução diluidora e da proporção de diluição na criopreservação do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* em criotubos de 2,0 mL

RESUMO

A criopreservação é uma técnica de grande interesse para a piscicultura, podendo contribuir para a minimização de impactos, otimização da produção e manutenção da variabilidade genética. Contudo, ainda são necessárias adequações nos protocolos para garantir maior consistência nos resultados obtidos com sêmen criopreservado. O objetivo deste estudo foi comparar estratégias de formulação de soluções diluidoras (frutose isolada x frutose associada ao NaCl) e diferentes proporções de diluição, visando maximizar a preservação espermática e o rendimento potencial de doses inseminantes em criotubos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, composto por dois diluidores e três proporções. O sêmen de oito machos com alta qualidade inicial foi criopreservado utilizando metanol 10% como crioprotetor, criotubos de 2,0 mL como recipiente de armazenamento do sêmen e dispostos em nitrogênio líquido. Para alterações morfológicas não houve efeito ($p>0,05$) da interação solução $\times$ proporção, soluções ou proporções testadas. Para integridade de membrana, o diluidor contendo apenas frutose apresentou melhores resultados ($p<0,05$). A taxa de motilidade e as velocidades espermáticas foram superiores no diluidor contendo apenas frutose. Para VCL, VAP e VSL, as proporções 1:3 e 1:6 apresentaram melhores resultados em comparação à 1:9. Conclui-se que o uso da solução diluidora composta predominantemente por frutose apresentou maior eficiência na manutenção da qualidade espermática após o processo de descongelamento e que a proporção 1:3 é mais indicada e pode ser aplicada no procedimento de criopreservação utilizando tubos criogênicos de 2,0 ml em *Piaractus mesopotamicus*.

Palavras-chave: Aquicultura, reprodução, congelamento, sêmen

ABSTRACT

Cryopreservation is a technique of great interest to fish farming, as it can contribute to minimizing impacts, optimizing production, and maintaining genetic variability. However, adjustments to protocols are still needed to ensure greater consistency in the results obtained with cryopreserved semen. The objective of this study was to compare formulation strategies for diluent solutions (isolated fructose vs. fructose associated with NaCl) and different dilution ratios, aiming to maximize sperm preservation and the potential yield of inseminating doses in cryotubes. The experimental design was completely randomized, in a 2x3 factorial scheme, composed of two diluents and three ratios. Semen from eight males with high initial quality was cryopreserved using 10% methanol as a cryoprotectant, 2.0 mL cryotubes as semen storage containers, and placed in liquid nitrogen. For morphological alterations, there was no effect ($p>0.05$) of the solution x ratio interaction, solutions, or ratios tested. For membrane integrity, the diluent containing only fructose showed better results ($p<0.05$). Sperm motility rate and velocities were higher in the diluent containing only fructose. For VCL, VAP, and VSL, the 1:3 and 1:6 ratios showed better results compared to 1:9. It is concluded that the use of the diluent solution composed predominantly of fructose showed greater efficiency in maintaining sperm quality after the thawing process and that the 1:3 ratio is more suitable and can be applied in the cryopreservation procedure using 2.0 ml cryogenic tubes in *Piaractus mesopotamicus*.

Keywords: Aquaculture, reproduction, freezing, semen

1. Introdução

O pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1877) (Characiformes: Serrasalminidae) é um peixe de água doce nativo da América do Sul, amplamente encontrado na região da Bacia do Prata (Calcagnotto e DeSalle, 2009). É considerada uma espécie de grande importância econômica devido à qualidade e ao sabor da carne que favorece a aceitação no mercado consumidor (Urbinati e Gonçalves, 2006), ao rápido crescimento (Jomori et al., 2005) e ao bom desempenho em sistemas de criação (Abimorad e Carneiro, 2004). Esses aspectos contribuíram para a expansão da produção no Brasil, totalizando 7,74 mil toneladas e garantindo a sexta posição no ranking nacional de produção de peixes (IBGE, 2025).

Apesar de ser uma espécie que apresenta tecnologia de produção em sistemas comerciais relativamente eficiente, ainda carece de técnicas que podem ser aprimoradas e utilizadas para maximizar a produção, como é o caso de técnicas de reprodução em laboratórios. Dentre estas, a criopreservação espermática desempenha um papel essencial na manutenção da diversidade genética (Streit Jr. et al., 2024), possibilitando a conservação da estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos armazenados em baixas temperaturas, tornando-os geneticamente viáveis, reversivelmente inativos do ponto de vista metabólico e com o mínimo possível de perda de eficácia (Pegg, 2007).

Entretanto, para obter sucesso na criopreservação, é necessária a utilização de soluções crioprotetoras eficientes e específicas que irão atuar de formas distintas para cada espécie (Rosato e Iaffaldano, 2013). Para compor esta solução, a escolha de uma solução diluidora eficiente é imprescindível, que consistem em misturas de sais ou carboidratos adicionadas ao sêmen, com a finalidade de nutrir as células, enquanto o crioprotetor protege as células contra danos causados pela grande variação de temperatura (Salmito-Vanderley et al., 2012), de forma que mantenha o equilíbrio do pH, a força iônica, os tipos de íons e a pressão osmótica adequados ao sêmen de cada espécie (Morisawa, 2008).

Em razão dessas particularidades, há uma ampla variedade de formulações possíveis, devendo o diluidor atender a determinados requisitos para garantir sua eficiência na ativação (Alavi e Cosson, 2006), além de apresentar estabilidade durante o armazenamento e ser estéril, evitando a contaminação por microrganismos potencialmente prejudiciais às células espermáticas (Legendre e Billard, 1980).

Em trabalhos com criopreservação de sêmen de *P. mesopotamicus* os diluentes já utilizados foram a água de coco em pó (ACP-104) combinada com glicose (Teodozia et al., 2020), glicose e gema de ovo (Carolsfeld et al., 1990, 2003; Streit Jr et al., 2006); V2e (NaCl, NaHCO₃, KCL, Glicose, Gema de ovo) (Fogli da Silveira et al., 1990) e BTS ® (Órfão et. al., 2010).

O NaCl utilizado como diluidor na criopreservação já foi testado com sucesso para o gênero *Brycon* em espécies como *Brycon nattereri* (Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2012) e *Brycon orbignyanus* (Maria et al., 2006). No entanto, embora existam diversos protocolos de conservação de sêmen desenvolvidos para Characiformes, para o *P. mesopotamicus* ainda são limitados, sem relatos do uso de NaCl como diluidor específico para essa espécie no processo de criopreservação.

Em razão disso, a padronização de protocolos personalizados para a criopreservação é essencial, tal como verificado por Seabra de Souza (2022) com o uso de frutose a 5% como solução diluidora para a espécie em estudo. Apesar de resultados promissores para aplicação na produção, a associação de outras soluções ainda é uma possibilidade a ser testada para que se obtenha um protocolo com resultados mais consistentes.

Outro ponto importante no contexto da criopreservação, é a proporção sêmen: solução crioprotetora. Este fator é crucial para manter a estabilidade das células espermáticas em um meio que evitará a formação de cristais de gelo, sendo comumente aplicado em peixes Sul-americanos a proporção de 1:3 a 1:10 de sêmen:solução (Viveiros e Godinho, 2009). Porém, quando pensamos em utilizar em sistemas comerciais, proporções altas de soluções crioprotetoras podem ser um entrave, principalmente devido a limitação da quantidade de células espermáticas disponíveis para fecundação, necessitando-se, portanto, de um volume relativamente grande a ser estocado em palhetas e/ou tubos criogênicos, comprometendo a viabilidade comercial da técnica. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da solução diluidora composta por NaCl na concentração de 0,5% combinadas ou não com frutose (5%) nas proporções de 1:3, 1:6 e 1:9 (sêmen:solução), no processo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*.

2. Material e métodos

2.1. Seleção de reprodutores

Todos os exemplares, com cerca de cinco anos de idade, foram coletados durante o período reprodutivo (janeiro) na estação de piscicultura da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (24°36'31"S; 47°53'48"W). Anteriormente ao experimento, os animais foram mantidos (0,13 kg/m³), em viveiros escavados (600 m²; 1,5 m de profundidade) com renovação diária de 5–10% da água, fotoperíodo natural e alimentados com ração comercial (28%PB) três vezes por semana a 1% da biomassa.

Para o experimento foram selecionados oito machos de *P. mesopotamicus* (2365±336,75 g) destinados à criopreservação. Foram considerados aptos à reprodução os machos que liberaram sêmen mediante pressão abdominal no sentido encéfalo-caudal aos quais foram transferidos até o laboratório de Aquicultura da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - FCAVR/UNESP (24°31'55"S e 47°51'34"W) para realização dos procedimentos experimentais. Os peixes foram alocados em caixas d'água circulares de 500 L com aeração constante (temperatura (°C): 24,9 °C±0,17; pH: 6,55±0,21; oxigênio dissolvido (ppm): 5,61±1,54; amônia: 0,5±0,39 (mg/L) e em seguida submetidos ao protocolo de indução hormonal.

2.2. Indução hormonal e coleta dos gametas

Os peixes foram induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) diluído em solução salina (0,9% NaCl - 0,50 mL kg⁻¹) com dosagem única de 2,5 mg de EBHC kg⁻¹. Após aproximadamente 240 horas-grau da indução hormonal os machos foram sedados em Eugenol (10 mg/L) e em seguida submetidos ao processo de coleta do sêmen por meio de extrusão, que constitui na realização de massagem na região abdominal no sentido encéfalo-caudal (Romagosa, 1990b; Bernardino e Lima, 1999). O material seminal foi armazenado em tubo de ensaio graduado tipo Falcon de 15 mL e alocado em caixas de isopor contendo gelo em 15 °C (Sanches et al., 2015) para posterior análises espermáticas e ao processo de congelamento.

2.3. Delineamento experimental

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x3) composto por sêmen provenientes de oito machos criopreservados por dois diluidores sendo o primeiro contendo a combinação de NaCl 0,5% com Frutose 5,0% e o

segundo apenas + Frutose 5,0% nas três proporções de 1:3, 1:6 e 1:9 (sêmen:solução), considerando em todas o metanol 10% como crioprotetor intracelular (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos aplicados para criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*

Tratamento	Crioprotetor*	Diluidor* + concentração	Proporção
1	Metanol 10%	NaCl 0,5% + Frutose 5,0%	1:3
2		NaCl 0,5% + Frutose 5,0%	1:6
3		NaCl 0,5% + Frutose 5,0%	1:9
4		Frutose 5,0%	1:3
5		Frutose 5,0%	1:6
6		Frutose 5,0%	1:9

* Todos os reagentes utilizados foram da marca Synth®.

2.4. Criopreservação

Para o congelamento das amostras, o material seminal de oito machos foi diluído individualmente em solução crioprotetora (pH 7,7±0,35) em uma caixa de isopor contendo gelo (15°C de temperatura ambiente). O material foi envasado em criotubos de 2,0 mL (Kasvi®) com tempo de equilíbrio de 15 minutos, alocados em racks e expostos em vapor de nitrogênio em um container criogênico do tipo *Dry shipper* (YDH-8-80/8 litros) a -170°C durante 2 horas. Após, os criotubos foram transferidos para um container “tipo líquido” (XT20/40 litros) onde foram congelados em nitrogênio líquido a -196°C por 2 horas. Para o descongelamento, um criotubo de cada tratamento foi retirado individualmente e imerso imediatamente em banho-maria por 120 segundos/60°C. Na sequência, realizou-se as análises espermáticas de concentração, morfologia, integridade de membrana e parâmetros cinéticos por análise computadorizada.

2.5. Análises espermáticas

Para a concentração espermática, o sêmen foi fixado em formol salino tamponado (4,6%) na proporção de 1:1000 µL e as células quantificadas em microscópio de luz trinocular (SolaristBel) com objetiva de 40X, conforme Sanches et al. (2011), calculada de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para sêmen de mamíferos.

Na sequência, amostras de sêmen descongelados foram fixadas em formol salino tamponado (4,6%) contendo corante Rosa de Bengala® (Streit Jr et al., 2004) na

proporção de 1:2:200 (sêmen:corante:formol) e para sêmen fresco na proporção de 1:10:1000. A confecção das lâminas seguiu protocolo de Sanches et al. (2015) tipo gota escorrida, analisando-se 200 células por campo em microscópio de luz (60X) e classificando-as em espermatozoides normais ou defeituosos conforme Streit Jr et al. (2009).

Para a integridade de membrana as amostras foram analisadas de acordo com método de coloração (eosina-nigrosina) proposto por Blom (1950). Foram considerados vivos aqueles com coloração branca e mortos aqueles com coloração vermelha ou rosada (permeáveis ao corante) (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986).

A ativação espermática para a avaliação da cinética, foi realizada utilizando-se solução de frutose 2,5% na proporção (sêmen:ativador) de 1:800, 1:200, 1:100 e 1:50 para sêmen fresco, diluição 1:3, 1:6 e 1:9 para os criopreservados, respectivamente. O procedimento foi realizado em tipo Eppendorf de 500µL, em seguida, uma alíquota de 5µL foi adicionada em câmara de Neubauer espelhada disposta na platina do microscópio para gravação dos vídeos. Após a ativação os vídeos (100 fps) foram registrados com câmera Basler acA640-120gc, acoplada a microscópio de luz trinocular (LT3000T PI) com objetiva de 20X conectado ao computador (Intel® Core™ i5-10210U, 1,6 GHz, 8 GB de RAM) com sistema operacional Microsoft Windows 10. As análises foram realizadas 10 segundos pós-ativação de 0,25 s (25 frames) de vídeo, conforme descrito por Sanches et al. (2010; 2013), utilizando o software livre ImageJ/plugin CASA (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). Foram avaliados os parâmetros taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL), adotando-se como critérios mínimos no CASA os valores de VSL=9, VAP=12 e VCL=25, adaptados de Neumann et al. (2013).

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância fatorial em esquema (2x3) a 5% de significância. Em caso de efeito dos tratamentos, foi aplicada análise de comparação de médias de Tukey ao mesmo nível de significância. Os pressupostos de homogeneidade de resíduos e homocedasticidade das variâncias foram testados. Teste de Dunnett foi empregado especialmente para comparar cada média dos tratamentos com a média do tratamento controle (sêmen fresco), individualmente.

3. Resultados

Os valores dos parâmetros do sêmen fresco referentes aos oito machos utilizados e as médias de cinética espermática estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros do sêmen fresco (n=8) de *P. mesopotamicus*

Parâmetro	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Erro padrão
Volume (mL)	9,33	9,00	8,50	11,00	0,75	0,27
Volume relativo (mL/Kg)	3,95	3,99	3,27	4,95	0,49	0,18
[spz] ($\times 10^9$/mL)	22,81	23,29	20,19	24,96	1,72	0,70
Motilidade (%)	98,05	98,52	94,94	99,07	1,27	0,57
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	195,62	194,13	164,88	229,96	17,41	8,71
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	136,63	136,94	114,04	151,34	11,39	6,57
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	106,56	110,48	68,22	122,51	15,73	11,12
% Normais	53,25	52,50	49,00	59,50	3,23	3,23
% Íntegros	96,69	97,50	92,50	99,00	2,09	0,74

Na análise de alterações morfológicas (Tabela 3), não houve efeito significativo ($p>0,05$) dos tratamentos criopreservados para a interação (solução x proporção) e nem para os efeitos individuais das soluções e das proporções. Além disso, quando comparados ao controle verificou-se ausência de efeito ($p>0,05$). Os espermatozoides mantiveram a integridade estrutural, apresentando consideráveis taxas de espermatozoides normais e baixa incidência de anomalias. Esses resultados indicam que os procedimentos de criopreservação utilizados não comprometeram a morfologia espermática da espécie estudada.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros de alterações morfológicas (média $\pm$ desvio padrão) referentes aos tratamentos criopreservados com duas diferentes soluções diluidoras e três proporções para o sêmen de *P. mesopotamicus*

Tratamentos	Normais (%)	Anormalidades (%)				
		Cauda dobrada	Cauda quebrada/fraturada	Gota citoplasmática	Cabeça solta	Cauda solta
NaCl+Frut 1:3	53,93 $\pm$ 5,40	9,63 $\pm$ 1,51	7,9 $\pm$ 2,98	9,25 $\pm$ 2,45	10,00 $\pm$ 2,25	9,31 $\pm$ 2,12
Frut 1:3	52,75 $\pm$ 5,16	8,88 $\pm$ 1,43	9,12 $\pm$ 3,03	9,06 $\pm$ 2,55	9,87 $\pm$ 1,99	10,12 $\pm$ 1,86
NaCl+Frut 1:6	55,18 $\pm$ 3,70	9,44 $\pm$ 2,19	9,12 $\pm$ 2,53	8,38 $\pm$ 2,28	9,19 $\pm$ 1,98	8,62 $\pm$ 2,01
Frut 1:6	54,19 $\pm$ 6,59	8,56 $\pm$ 1,66	7,75 $\pm$ 2,82	11,31 $\pm$ 1,56	8,75 $\pm$ 1,65	9,44 $\pm$ 1,63
NaCl+Frut 1:9	55,31 $\pm$ 4,0	8,56 $\pm$ 1,69	8,06 $\pm$ 2,64	9,31 $\pm$ 1,73	8,44 $\pm$ 2,29	10,31 $\pm$ 1,60
Frut 1:9	54,63 $\pm$ 5,25	8,31 $\pm$ 1,96	8,75 $\pm$ 2,24	8,69 $\pm$ 2,12	10,56 $\pm$ 1,99	9,06 $\pm$ 1,66
Fresco	53,25 $\pm$ 3,45	8,50 $\pm$ 2,33	10,19 $\pm$ 2,33	9,62 $\pm$ 2,57	8,75 $\pm$ 1,71	9,69 $\pm$ 1,83
F e p-valor (diluidor)	F _(1;42) =0,42, p=0,52	F _(1;42) =1,51, p=0,23	F _(1;42) =0,04, p=0,83	F _(1;42) =1,31, p=0,26	F _(1;42) =0,78, p=0,38	F _(1;42) =0,06, p=0,81
F e p-valor (proporção)	F _(2;42) =0,46, p=0,63	F _(2;42) =0,89, p=0,42	F _(2;42) =0,005, p=0,99	F _(2;42) =0,70, p=0,50	F _(2;42) =0,91, p=0,41	F _(2;42) =0,72, p=0,49
F e p-valor (interação)	F _(2;42) =0,01, p=0,99	F _(2;42) =0,14, p=0,87	F _(2;42) =1,08, p=0,35	F _(2;42) =3,27, p=0,05	F _(2;42) =1,88, p=0,16	F _(2;42) =1,70, p=0,19

Tratamentos: NaCl+Frut (NaCl+Frutose); Frut (Frutose).

A integridade de membrana dos espermatozoides foi significativamente influenciada pelo tipo de diluidor ($p < 0,05$), sendo que o diluidor contendo apenas frutose apresentou maior preservação da membrana em comparação ao diluidor NaCl+Frut (Figura 1A). Por outro lado, a proporção de sêmen para solução crioprotetora (Figura 1B) não afetou significativamente a integridade ($p > 0,05$) e não foi observada interação ($p > 0,05$) entre diluidor e proporção (Figura 1C). A análise de Dunnett mostrou que todos os tratamentos criopreservados apresentaram integridade de membrana inferior ao controle ($p < 0,05$).

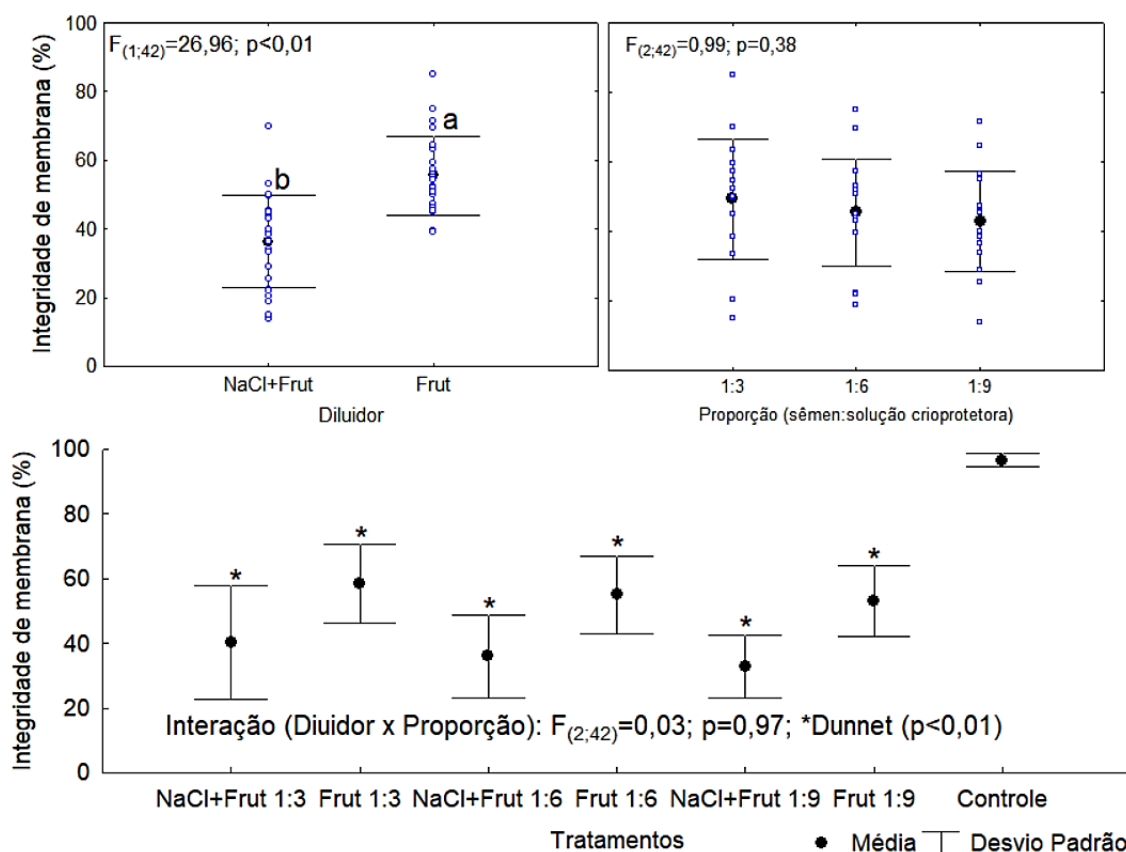


Figura 1. Índices de integridade de membrana obtidas dos tratamentos com esperma criopreservado de *P. mesopotamicus*, comparando dois diferentes diluidores (Figura 1A), três proporções (Figura 1B) e interação diluidor x proporção (Figura 1C). Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Asteriscos (*) representam diferença ($p<0,05$) de cada tratamento comparados individualmente ao fresco (controle) de acordo com teste de Dunnett. Tratamentos: NaCl+Frut (NaCl+Frutose); Frut (Frutose).

A análise da motilidade espermática (MOT), apresentada na Figura 2, não revelou interação significativa ($p>0,05$) entre diluidores e proporções (sêmen:solução), evidenciando apenas efeitos individuais. Observou-se efeito do diluidor, com maiores valores de MOT para o diluidor Frut em comparação ao NaCl+Frut ($p<0,05$), enquanto a proporção não influenciou esse parâmetro ($p>0,05$).

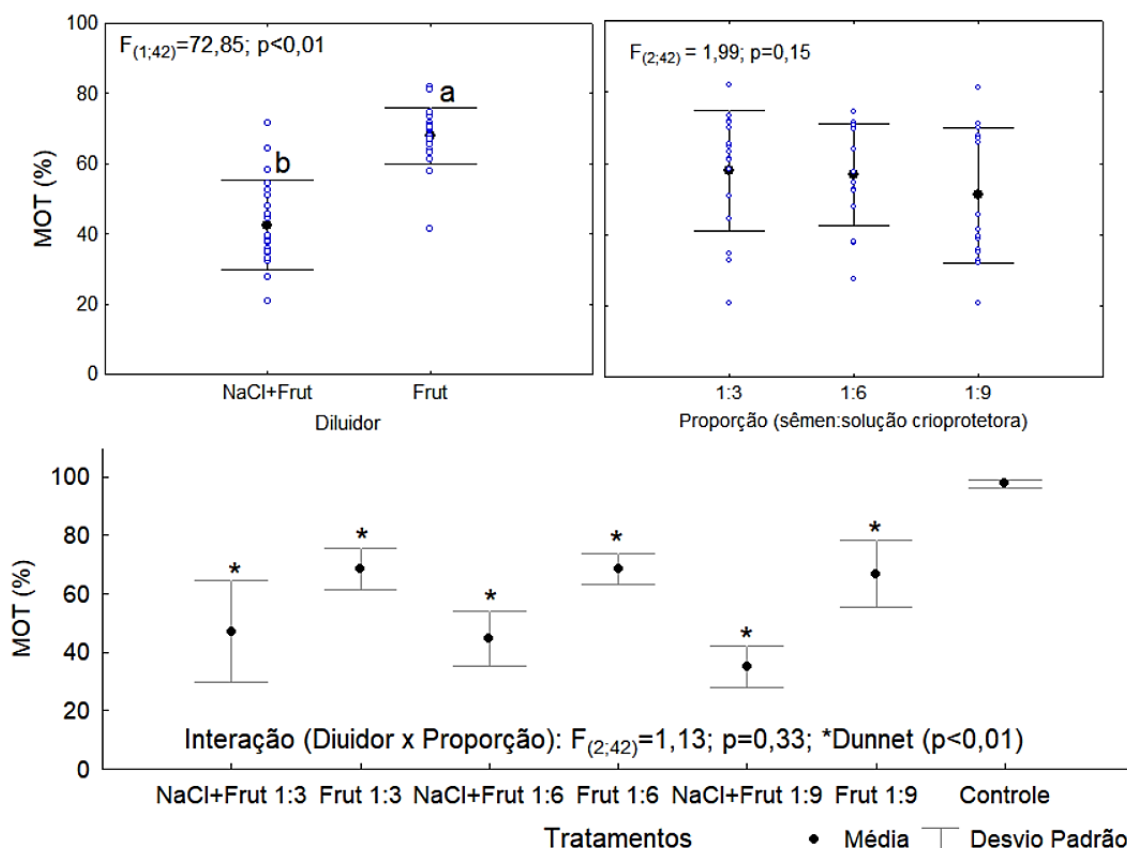


Figura 2. Taxas de motilidade (MOT) obtidas dos tratamentos com espermatozoides de *P. mesopotamicus*, comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Asteriscos (*) representam diferença ($p<0,05$) de cada tratamento comparados individualmente ao fresco (controle) de acordo com teste de Dunnett. Tratamentos: NaCl+Frut (NaCl+Frutose); Frut (Frutose).

Para a velocidade curvilinear (VCL), apresentada na Figura 3, também não houve interação significativa entre diluidores e proporções ($p>0,05$), sendo observados apenas efeitos isolados. O diluidor Frut apresentou maiores valores de VCL em relação ao NaCl+Frut ($p<0,05$). Além disso, as proporções 1:3 e 1:6 foram superiores à proporção 1:9 ($p<0,05$).

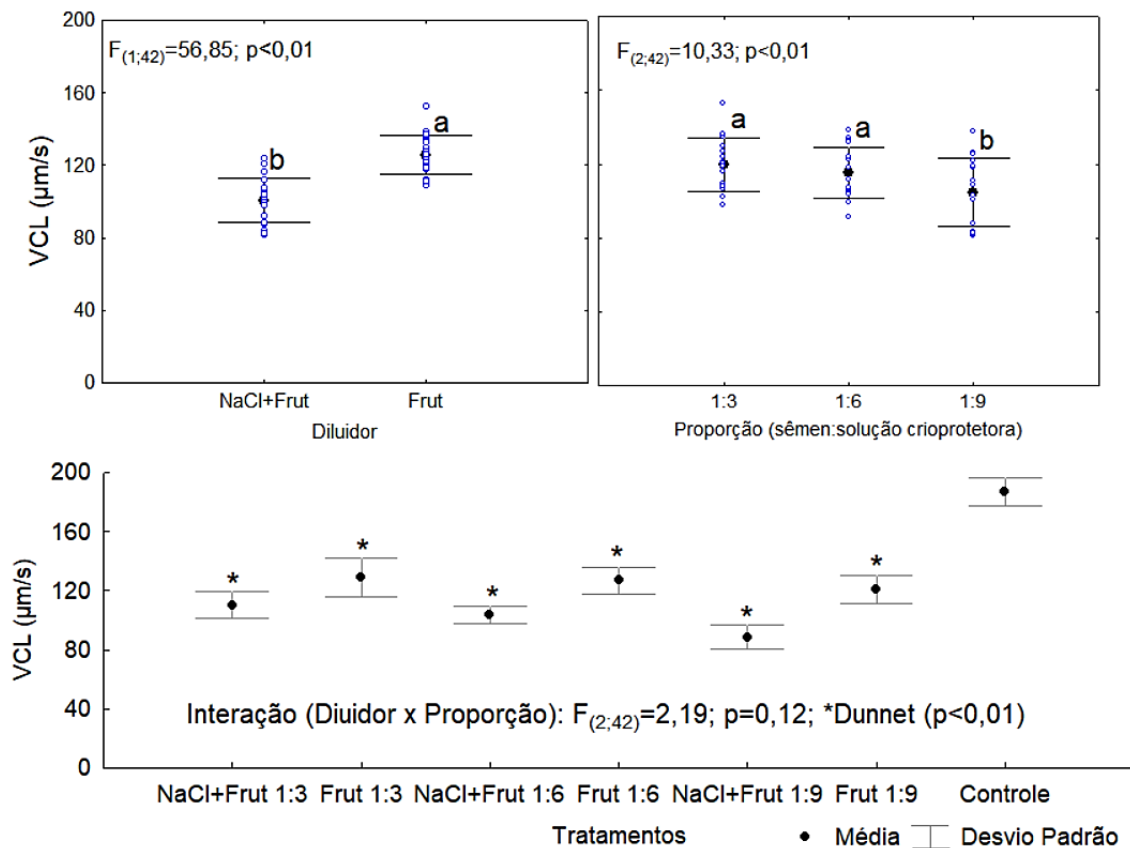


Figura 3. Taxas de velocidade curvilínea (VCL) obtidas dos tratamentos com espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus*, comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Asteriscos (*) representam diferença ($p<0,05$) de cada tratamento comparados individualmente ao fresco (controle) de acordo com teste de Dunnett.

A velocidade média de deslocamento (VAP), mostrada na Figura 4, seguiu o mesmo padrão, sem interação significativa entre os fatores ($p>0,05$). Houve efeito do diluidor, com maiores valores para Frut em comparação ao NaCl+Frut ($p<0,05$), e efeito da proporção, em que 1:3 e 1:6 apresentaram valores superiores à proporção 1:9 ($p<0,05$).

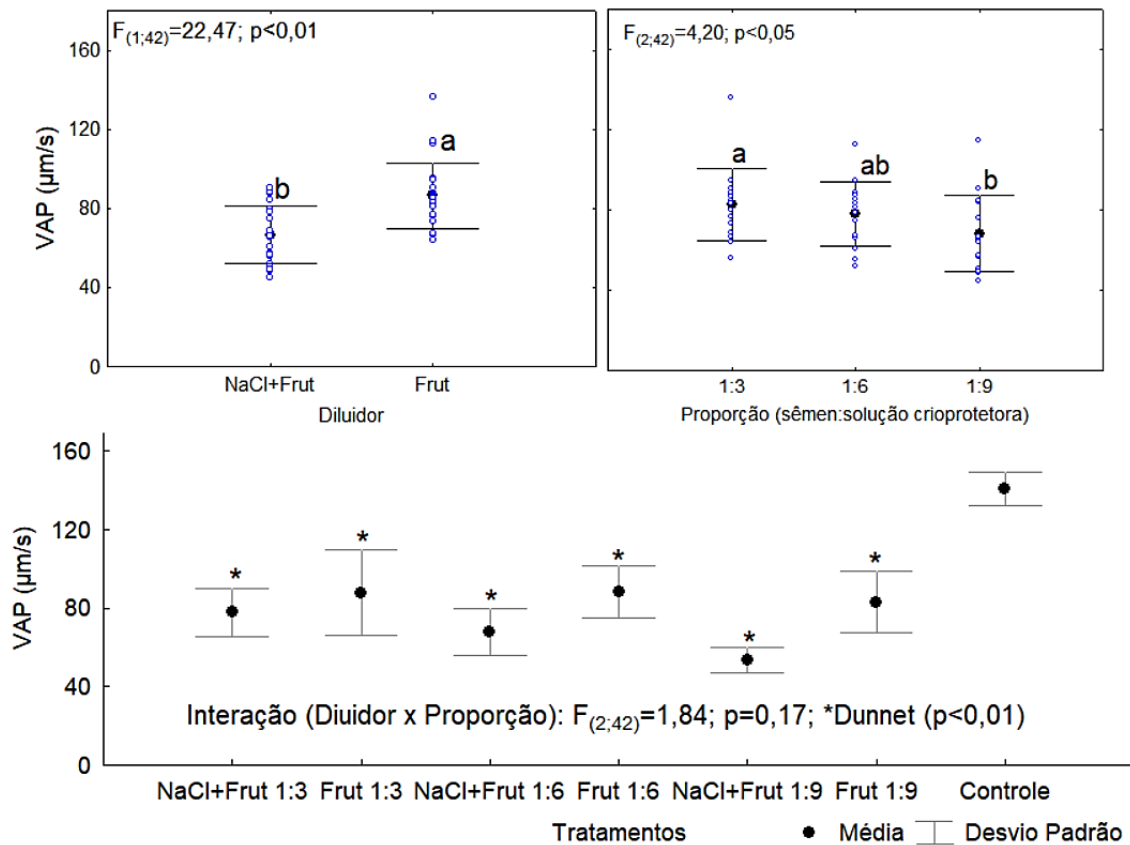


Figura 4. Taxas de velocidade média de deslocamento (VAP) obtidas dos tratamentos com espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus*, comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Asteriscos (*) representam diferença ($p<0,05$) de cada tratamento comparados individualmente ao fresco (controle) de acordo com teste de Dunnett.

Dado de velocidade em linha reta (VSL), apresentado na Figura 5, também não apresentou interação significativa entre diluidores e proporções ($p>0,05$). O diluidor Frut resultou em maiores valores de VSL em relação ao NaCl+Frut ($p<0,05$), e as proporções 1:3 e 1:6 foram superiores à proporção 1:9 ($p<0,05$).

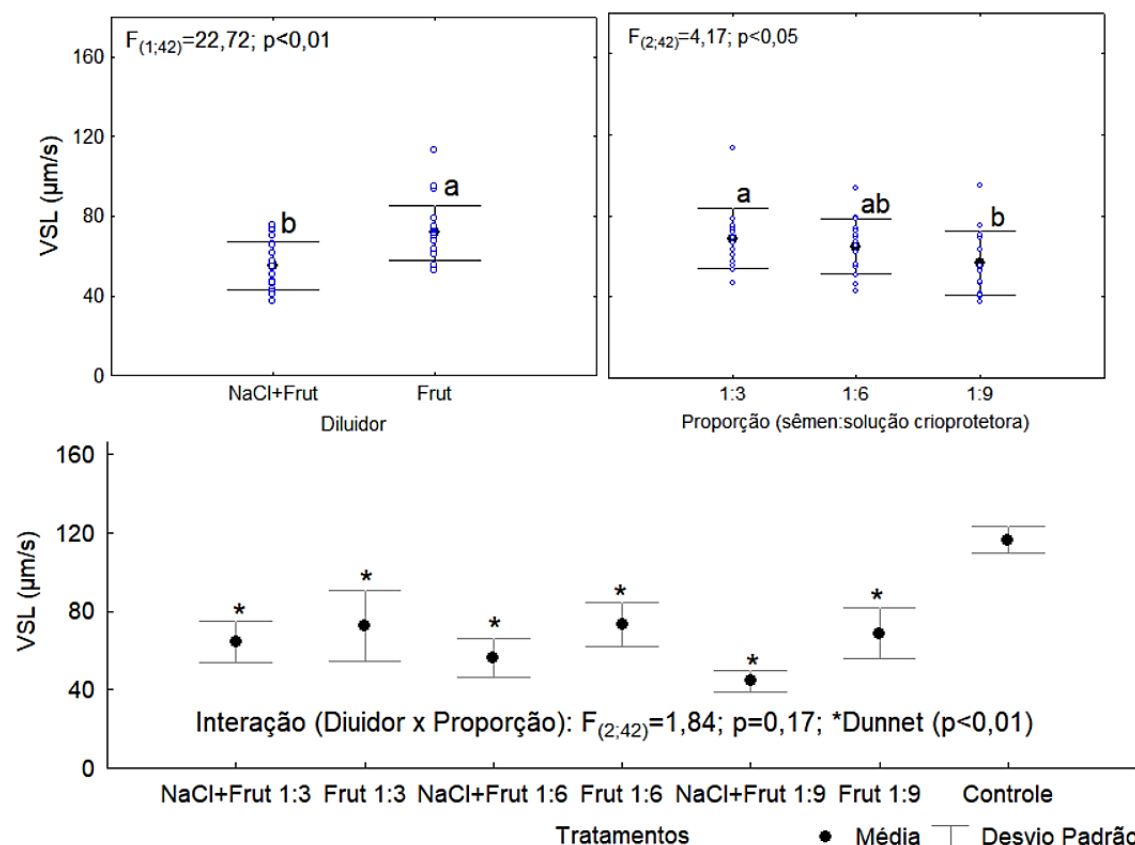


Figura 5. Taxas de velocidade em linha reta (VSL) obtidas dos tratamentos com espermatozoide de *P. mesopotamicus*, comparando dois diferentes diluidores, três proporções e interação diluidor x proporção. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Asteriscos (*) representam diferença ($p < 0,05$) de cada tratamento comparados individualmente ao fresco (controle) de acordo com teste de Dunnett

4. Discussão

Os parâmetros espermáticos observados na análise do sêmen fresco neste estudo garantiram a confiabilidade necessária para a aplicação dos diferentes protocolos de criopreservação propostos, dados que acordam ao já visto para a mesma espécie (Fogli da Silveira et al., 1990; Maria et al., 2004; Galo et al., 2019; Teodozia et al., 2020).

Verificou-se no presente experimento que a utilização de NaCl associado à frutose não promoveu melhoria nos parâmetros de qualidade espermática após o descongelamento, embora a adição de açúcares contribua para o controle osmótico e ofereça proteção extracelular durante o processo de congelamento (Maria et al., 2006; Viveiros et al., 2012). Estes resultados diferenciaram de trabalhos em que este composto foi usado com bons resultados como diluidor na criopreservação de sêmen de espécies do

gênero *Brycon* (Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2012; Maria et al., 2006) e em algumas espécies marinhas (Suquet et al., 2005).

Para *Brycon*, o NaCl isolado frequentemente apresenta desempenho semelhante ou até superior a soluções contendo apenas açúcares, evidenciando que o controle osmótico (osmolaridade) promovido pelo NaCl é o principal fator responsável pela eficiência da criopreservação nessas espécies. Por outro lado, para *P. mesopotamicus*, a regulação da motilidade nessa espécie depende não apenas da osmolaridade, mas também da composição iônica específica do plasma seminal (Maria et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Vale ressaltar que os diluidores são formulados para serem compatíveis com o plasma seminal dos peixes, de modo que os componentes constituintes do meio diluente assegurem o pH, força iônica, tipo de íons e pressão osmótica do sêmen, em que cada espécie de peixe possui sêmen com características específicas (Lanes et al., 2008).

Para tanto, por ser uma família diferente (Serrasalminidae), o *P. mesopotamicus* possui uma composição do plasma seminal diferente. Em *Brycon*, o plasma seminal possui composição predominantemente iônica, com elevada concentração de Na^+ e Cl^- , osmolaridade relativamente alta e baixa quantidade de compostos orgânicos, o que faz com que soluções simples de NaCl mimetizem adequadamente esse meio e mantenham os espermatozoides em estado quiescente (Maria et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2012). Já para o *P. mesopotamicus*, o plasma seminal apresenta composição iônica mais complexa, com maior participação relativa de íons como K^+ , Ca^{2+} e bicarbonato, além de maior dependência do equilíbrio ácido-básico para o controle da motilidade espermática (Viveiros et al., 2012; Kuradomi et al., 2016). Para tanto, mesmo o NaCl estando presente no plasma, a sua adição não contribuiu para melhoria do procedimento.

Isso é sustentado por Gwo (2000), ao qual comenta que em temperaturas ultrabaixas, as características seminais só serão preservadas se o sêmen for diluído em soluções adequadas, para que, durante o congelamento e o descongelamento, as trocas osmóticas das células possam ser continuamente restabelecidas, corrigindo os sucessivos desequilíbrios nas concentrações iônicas dos solutos, que acompanham as mudanças de temperaturas.

O NaCl pode ser utilizado também como componente de plasma seminal artificial para diluir os espermatozoides de peixes (Hezavehei et al., 2018). No caso do *P. mesopotamicus*, Bedore (1999) avaliou o uso de soluções de NaCl como diluente e verificou que a concentração salina exerce influência direta sobre a manutenção da

imobilidade espermática e a preservação da motilidade após a ativação. O autor observou que soluções de NaCl em torno de 0,9% foram eficientes para manter os espermatozoides viáveis e estáveis antes da ativação, evitando a motilidade precoce e preservando a capacidade fertilizante. Concentrações inferiores favoreceram a ativação indesejada, enquanto concentrações mais elevadas tenderam a reduzir a motilidade e a viabilidade espermática. No entanto, embora soluções à base de NaCl tenham mantido a viabilidade do sêmen de *P. mesopotamicus*, essas soluções não são capazes de proteger as células contra os estresses osmóticos, térmicos e estruturais associados à criopreservação (Maria et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Cabrita et al., 2010), pois ocorrem alterações na osmolaridade, no pH e na integridade de membrana, fazendo com que haja a presença de açúcares e outros componentes protetores que não estão presentes em soluções salinas simples (Viveiros et al., 2012; Babiak et al., 2012).

Ainda assim, o presente experimento demonstrou que, apesar de a criopreservação comprometer a integridade da membrana em comparação ao sêmen fresco, a utilização do diluidor à base de frutose simples favoreceu uma melhor manutenção estrutural dos espermatozoides. Isso ocorre porque a frutose, mesmo sendo um crioprotetor de baixo peso molecular capaz de atravessar a membrana espermática, contribui para o sucesso da motilidade ao reduzir a formação de cristais de gelo intracelulares e atuar como relevante fonte de energia. Além disso, a frutose fornece substrato energético essencial para as células germinativas masculinas (Purdy, 2006).

Outro ponto relevante no presente experimento foram as melhores velocidades (VCL, VAP e VSL) verificadas quando utilizou-se as proporções 1:3 e 1:6 em comparação a 1:9 (semen:solução crioprotetora), o que demonstra a possibilidade de utilizar maior quantidade de sêmen e consequentemente células disponíveis para a fecundação, algo essencial para ampliar a capacidade do material fecundante (Yang e Tiersch, 2009). De acordo com Ögretmen et al. (2015), a proporção entre as quantidades de diluidor e sêmen (taxa de diluição) diminui a concentração dos componentes do plasma seminal, o que pode tornar as células mais vulneráveis ao estresse oxidativo. Por outro lado, não se verificou prejuízos nas taxas de motilidade, integridade de membrana e alterações morfológicas no presente experimento, indicando que a proporção 1:3 pode ser aplicada com sucesso para manter características espermáticas em qualidades satisfatórias.

Apesar dos resultados observados da qualidade espermática após a criopreservação serem promissores, verificou-se redução quando comparáveis ao sêmen fresco, ou seja,

os procedimentos empregados não foram capazes suficientes de manter a qualidade original. Entretanto, pensando que este material pode ser armazenado por tempo indeterminado e que as características observadas estão dentro do esperado para a mesma espécie quando ativadas com água destilada (Seabra de Souza, 2022), este trabalho traz uma contribuição relevante para a área.

5. Conclusão

Conclui-se que o uso da solução diluidora composta predominantemente por frutose apresentou maior eficiência na manutenção da qualidade espermática após o processo de descongelamento e que a proporção 1:3 é mais indicada e pode ser aplicada no procedimento de criopreservação utilizando tubos criogênicos de 2,0 ml em *Piaractus mesopotamicus*.

Referências

- ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J. 2004. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1101-1109. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000500001>.
- ALAVI, S. M. H., COSSON, J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, v.30, p.1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004>.
- BABIAK, I.; RODINA, M.; RANDÁK, T.; LINHART, O. 2012. Effects of cryopreservation on sperm characteristics, fertilization rates and larval survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 338-341: 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.027>.
- BEDORE, A.G. 1999. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignianus*)**. Belo Horizonte. 53p. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG).
- BERNARDINO, G.; LIMA, V.A. 1999. Situação da criação de Colossoma e *Piaractus* no sudeste do Brasil (1988-1991). In: SOUZA, R.H.S. Criação de Colossoma e *Piaractus* no Brasil. **IBAMA** (Ed), Brasília, p.173-232.
- BLOM, E. A. 1950. One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 176-177.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology** 26(5), p 623-635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>.
- CALCAGNOTTO, D., DESALLE, R., 2009. Population genetic structuring in Pacu *Piaractus mesopotamicus* across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotrop. Ichthyol.** v7, p.607-616. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000400008>.
- CAROLSFELD, J., GODINHO, H. P., ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B. J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990 Criopreservação do sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, 3(único): 1-4.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 49, 1998.
- FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E.T., CESTAROLLI, M.A., GODINHO, H.M., RAMOS, S.M., SILVEIRA, A.N., 1990. Spermatogenic evaluation, cryogenic preservation and fertility of the "pacu" *Piaractus mesopotamicus* [Holmberg, 1887], sperm, from induced spawning. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 17, pp. 1-13.
- GALO, J. M., STREIT-JUNIOR, D. P., OLIVEIRA, C. A., POVH, J. P., FORNARY, D. C., DIGMAYER, D., RIBEIRO, R. P. 2019. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, n.3, p.438-445. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.182391>.

- GWO, J.C. 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. **Aquaculture Research**, v.31, p.259-271. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00462.x>
- HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, HM; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reprod. Biomed. Online**, v.37, p.327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sidra: Banco de Tabelas Estatísticas. Tabela 3940: Produção da aquicultura. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 10 jan. 2026.
- JOMORI, R. K., CARNEIRO, D. J., MARTINS, M. I., PORTELLA, M. C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v.243, p.175-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.034>.
- KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W. 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do bagre, *Rhamdia hylarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 13, p. 95-100.
- KURADOMI, R.Y., SOUZA, T.G., SCHULZ, F.F.R.W., BOGERD, J., MOREIRA, R.G., FURLAN, L.R., ALMEIDA, E.A., MASCHIO, L.R., BATLOUNI, S.R. 2016. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, V. 225, p. 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.06.007>.
- LANES, C.F.C., OKAMOTO, M., CAVALCANTI, P.V., COLLARES, T., CAMPOS, V.F., DESCHAMPS, J.C., ROBALDO, R., MARINS, L., SAMPAIO, L.A. 2008. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. **Aquaculture**. 275. 361-365. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.025>.
- LEGENDRE, M., BILLARD, R. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, v 20, p 1859-1868. <https://doi.org/10.1051/rnd:19801012>
- MARIA, A.N., MURGAS, L.D.S., SILVA, M.O.B., MILIORINI, A.B., FRANCISCATTO, R.T., LOGATO, P.V.R. 2004. The effects of potassium iodide and sodium citrate on semen quality of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 191-194. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000100025>.
- MARIA, A.N., VIVEIROS, A.T.M., FREITAS, R.T.F., OLIVEIRA, A.V. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish, **Aquaculture**, V. 260, p. 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.011>
- MORISAWA, M. 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.362-70. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01126.x>.
- NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., TOLEDO, C. P. R., SANCHES, E. A. 2013. **Análise espermática computadorizada em peixes de água doce**: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre. 1ª ed. Toledo: LATRAAC/UNIOESTE, 86p.
- ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B.E.; KUTLUYER, F.; KAYIM, M. 2015. 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, p.1548-1552. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.001>.
- OLIVEIRA, A. V., VIVEIROS, A. T. M., MARIA, A. N., FREITAS, R. T. F., IZAÚ, Z. A. 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*.

- Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600025>.
- ORFÃO, L.H.; A.T.M. VIVEIROS, A.N. MARIA, E E.P.C. SILVA. 2010. Criopreservação do sêmen de pacu *Piaractus mesopotamicus*: **efeito de diluidores, crioprotetores e ativadores**. Pages 161-167 in Cyrino, J.E.P.; W.M. Furuya; R.P, Ribeiro, and J.D, Scorvo Filho, editors. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura III. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática [AQUABIO] Jaboticabal, SP. Brasil
- PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2ed. Totowa, **NJ: Humana Press Inc.** v.368, p.39-58, 2007.
- PURDY, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>.
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) = *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, v.86, p.105-110, 1990. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90225-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90225-C).
- ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 3, p. 508-516. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.008>.
- SALMITO-VANDERLEY, C.S.B; VIEIRA, M.J.A.F; LEITE, L.V; OLIVEIRA, F.C.E; LINHARES, R.A; SALGUEIRO, C.C.M; NUNES, J.F. 2012. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v.22, n.1, p.255-268.
- SANCHES, E. A., BOMBARDELLI, R. A., MARCOS, R. M., NEUMANN, G., DE TOLEDO, C. P. R., ROMAGOSA, E. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 153-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02598.x>.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., BAGGIO, D. M., TESSARO, L., BALEN, R. E., BOMBARDELLI, R. A. 2011. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1163-1167. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., R. Y. OKAWARA, R.Y., CANEPPELE, R. D., BOMBARDELLI, A., ROMAGOSA, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. **Journal of Applied Ichthyology**, v.29, p.1114-1122. <https://doi.org/10.1111/jai.12165>.
- SANCHES, E. A., OKAWARA, R. Y., CANEPPELE, D., TOLEDO, C. P. R., BOMBARDELLI, R. A., ROMAGOSA, E. 2015. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112h of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v.31, p.79-88. <https://doi.org/10.1111/jai.12728>.
- SEABRA DE SOUZA, Ana Regina. **Protocolo de criopreservação espermática de pacu *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras**. 2022. 81 f. Dissertação de mestrado – Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Jaboticabal, 2022. <http://hdl.handle.net/11449/232498>.
- STREIT JR, D. P., BENITES, C., MORAES, G. V., RIBEIRO, R. P., SAKAGUTI, E. S., CALDIERI, R. F. 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.289-297.

- STREIT JR., D. P., DE OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO, R. P., SIROL, R. N., DE MORAES, GALO, G. V., DIGMAYER, J. M. 2009. Motility, vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 159-167.
- STREIT JR, D.P., MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., POVH, J. A., SOUZA, E. D., OLIVEIRA, C.A.L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 2, p. 157–162.
- STREIT, D.P.; RODRIGUES, R.B; SANCHES, E.A; POVH, J.A; SIQUEIRA-SILVA, D.H; VASCONCELOS, A.C.N; ZHANG, T. Sperm Cryopreservation Protocols for Neotropical South American Species. In: STREIT, Danilo P.; ZHANG, Tiantian; Paredes, Stefania (Org.). **Cryobiology for South American Neotropical Fish Species**, [s. l.]: CRC Press, 2024. p. 193-219.
- SUQUET, M., NORMANT, Y., GAIGNON, J.L., QUÉMÉNER, L., FAUVEL, C. 2005. Effect of water temperature on individual reproductive activity of pollack (*Pollachius pollachius*), **Aquaculture**, V. 243, P. 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.021>
- TEODOZIA, E. R. P., ARAÚJO, M. S. O., LOPES, J. T., MONTENEGRO, A. R., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. 2020. Semen cryopreservation in *Piaractus mesopotamicus*: the effect of different diluents and freezing equipment. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, n. 2. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039>.
- URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D., 2006. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, p. 225–255. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000300010>.
- VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137–150, 2009.
- VIVEIROS, A.T.M., MARIA, A.N., AMARAL, T.B., ORFÃO, L.H, ISAU, Z.A., VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. 2012. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, 43: 546-555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02860.x>.
- 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**, v.67, p.661-672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>.
- YANG, H.& TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 149, p. 224-232, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.005>.

CAPÍTULO II – Artigo

Efeitos de diferentes estratégias de congelamento sobre a integridade celular e a motilidade espermática de *Piaractus mesopotamicus* em criotubos de 2,0 mL

RESUMO

O uso de diferentes métodos de congelamento durante o processo de criopreservação pode diminuir e eliminar fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após sua aplicação. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes estratégias de congelamento sobre a integridade celular e os parâmetros cinéticos do sêmen criopreservado de *Piaractus mesopotamicus* em criotubos de 2,0 mL. Para o congelamento foi utilizado um delineamento experimental em blocos casualizados, composto por quatro tratamentos e três pools de sêmen. As amostras foram submetidas a criopreservação em criotubos 2,0 mL dispostos em quatro tratamentos: 1: vapor de nitrogênio em caixa de isopor®; 2: dry shipper; 3: geladeira e 4: freezer. Para a fertilização, foi empregado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e três repetições (pools de sêmen), um “pool” de sêmen fresco (controle) ativados com solução de 2,5% de frutose. O dry shipper apresentou maiores médias de motilidade. Para VCL, VAP e VSL os métodos o tratamento por geladeira não diferiu estatisticamente do dry shipper, freezer e isopor. Para as alterações morfológicas, o dry shipper e freezer apresentaram maior percentual de espermatozoides normais. Os diferentes métodos de criopreservação não influenciaram as taxas de fertilidade. Conclui-se que o método de congelamento em dry shipper constitui uma alternativa viável para a criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus*, podendo ser incorporado aos protocolos de criopreservação da espécie.

Palavras-chave: Aquicultura, reprodução, sêmen, congelamento, fertilização

ABSTRACT

The use of different freezing methods during the cryopreservation process can decrease and eliminate factors that reduce sperm viability and fertility after application. The aim of this study was to evaluate the effect of different freezing strategies on the cellular integrity and kinetic parameters of cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus* in 2.0 mL cryotubes. For freezing, a randomized block design was used, consisting of four treatments and three semen pools. Samples were cryopreserved in 2.0 mL cryotubes arranged in four treatments: 1: nitrogen vapor in a styrofoam box; 2: dry shipper; 3: refrigerator; and 4: freezer. For fertilization, a completely randomized experimental design was employed, consisting of four treatments and three replicates (semen pools), one pool of fresh semen (control) activated with a 2.5% fructose solution. The dry shipper method showed higher average motility. For VCL, VAP, and VSL, the refrigerator treatment method did not differ statistically from the dry shipper, freezer, and styrofoam methods. For morphological alterations, the dry shipper and freezer methods showed a higher percentage of normal spermatozoa. The different cryopreservation methods did not influence fertility rates. It is concluded that the dry shipper freezing method constitutes a viable alternative for sperm cryopreservation of *Piaractus mesopotamicus*, and can be incorporated into cryopreservation protocols for this species.

Keywords: Aquaculture, reproduction, semen, freezing, fertilization

1. Introdução

O pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1877) (Characiformes: Serrasalminidae) é um peixe de água doce nativo da América do Sul (Calcagnotto e DeSalle, 2009), considerada uma espécie de grande importância econômica devido a qualidade e sabor da carne (Urbinati e Gonçalves, 2006), ao rápido crescimento (Jomori et al., 2005) e ao bom desempenho em sistemas de criação (Abimorad e Carneiro, 2004). Esses aspectos contribuíram para a expansão da produção no Brasil, totalizando 7,74 mil toneladas e garantindo a sexta posição no ranking nacional de produção de peixes (IBGE, 2025).

A criopreservação espermática em peixes desempenha um papel essencial para minimização de impactos e otimização da produção, garantindo principalmente uma alta variabilidade genética, pois é considerada um método confiável para preservação do material genético (Streit Jr. et al., 2024), que possibilita a conservação da estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos armazenados em baixas temperaturas, tornando-os geneticamente viáveis, reversivelmente inativos do ponto de vista metabólico e com o mínimo possível de perda de eficácia (Pegg, 2007).

As lesões causadas aos espermatozoides durante o processo de congelamento ocorrem em decorrência de diversos fatores, como a desidratação, cristalização/recristalização, mudanças na organização dos fosfolipídeos na membrana plasmática (Mazur, 1984; Watson, 2000), estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores, desidratação, aumento da concentração dos solutos e formação de cristais de gelo (Bortolozzo et al., 2008).

Quando o congelamento ocorre de forma lenta, a célula pode perder água suficiente de forma a não se congelar internamente, onde o meio ao redor das células torna-se levemente hiperosmótico, o que provoca aumento da tensão na membrana plasmática e consequentemente a desidratação celular (Mazur, 1984; Yang e Tiersch, 2009). Por outro lado, conforme a temperatura ocorre mais rapidamente, a célula começa a desidratar, momento em que cristais de gelo começam a se formar, rompendo a membrana, causando danos irreversíveis à célula (Rezende e Marques, 2009). A taxa de congelamento é um equilíbrio entre esses fatores (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Considerando sua finalidade, a criopreservação do sêmen de peixes surge como uma solução favorável para alcançar resultados satisfatórios para a espécie, onde é visível a importância do conhecimento e aperfeiçoamento dos processos de congelamento, como

o uso de técnicas que utilizem diferentes métodos de congelamento submetidos a diferentes temperaturas, o que pode minimizar os danos estruturais dos espermatozoides causados pelo processo de criopreservação e consequentemente desenvolver altas taxas de fertilidade (Purdy, 2006).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes estratégias de congelamento sobre a integridade celular e os parâmetros cinéticos do sêmen criopreservado de *Piaractus mesopotamicus* em criotubos de 2,0 mL.

2. Material e Métodos

2.1. Seleção dos reprodutores

A seleção dos reprodutores foi realizada em duas etapas. Inicialmente, foram selecionados nove machos de *P. mesopotamicus* ($3257,7 \pm 482,0$ g) destinados exclusivamente à criopreservação do sêmen. Na segunda etapa, após a avaliação do congelamento, selecionaram-se três fêmeas de *C. macropomum* ($1204,8 \pm 592,8$ g) para os testes de fecundação e mais dois machos ($3248,7 \pm 595,0$ g) de *P. mesopotamicus* para o tratamento controle com sêmen fresco. Todos os peixes, com cerca de cinco anos de idade, foram coletados no período reprodutivo (dezembro) na estação da APTA Regional de Pariquera-Açu/SP ($24^{\circ}36'31''\text{S}$; $47^{\circ}53'48''\text{W}$).

Os machos foram selecionados pela liberação de sêmen após leve pressão abdominal e as fêmeas foram escolhidas com base em sinais externos como abdômen dilatado e macio e papila genital avermelhada (Romagosa et al., 1990a) além da avaliação intra-ovárica, sendo aceitas apenas aquelas com mais de 60% dos oócitos em migração da vesícula germinativa. Em seguida, os peixes foram transportados em caixas com solução salina (1 g/L de NaCl) e oxigênio até o laboratório de Aquicultura da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - FCAVR/UNESP/Registro/SP/BR ($24^{\circ}31'55''\text{S}$ e $47^{\circ}51'34''\text{W}$), mantidos em tanques com aeração e parâmetros de água controlados (temperatura ($^{\circ}\text{C}$): $24,1^{\circ}\text{C} \pm 0,2$; pH: $6,8 \pm 0,3$; oxigênio dissolvido (ppm): $6,6 \pm 1,7$; amônia: $0,9 \pm 0,0$) e então submetidos à indução hormonal.

Antes do experimento, os animais foram mantidos em viveiros escavados de 600 m² e 1,5 m de profundidade média, sob sistema semi-intensivo, com renovação diária de 5 a 10% da água e fotoperíodo natural. A densidade de estocagem foi de 0,13 kg/m³, e os peixes foram alimentados três vezes por semana com ração contendo 28% de proteína

bruta, fornecida na proporção de 1% da biomassa. A alimentação foi suspensa 24 horas antes da coleta dos gametas.

2.2. Indução hormonal e coleta de gametas

Para a etapa do processo de criopreservação e posterior fecundação, os 11 machos utilizados foram induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) diluído em solução salina (0,9% NaCl - 0,5 mL kg⁻¹) com dosagem única de 2,5 mg EBHC kg⁻¹.

As fêmeas receberam duas dosagens (0,5 e 5,0 mg de EBHC kg⁻¹ acompanhadas de 0,5 mL/kg⁻¹ de prostaglandina sintética Ciosin® em um intervalo de doze horas) (Criscuolo-Urbinati et al., 2012). As aplicações foram realizadas em relação à ordem de coleta (primeiro os gametas masculinos e depois os gametas femininos) para evitar a perda da viabilidade dos ovócitos após a coleta (Sanches et al., 2014).

Após aproximadamente 240 horas-grau da indução hormonal os peixes foram individualmente submetidos ao processo de extrusão (Romagosa, 1990b; Bernardino e Lima, 1999). Para os machos, a primeira gota de sêmen coletada foi descartada para evitar contaminação pela presença de urina. O restante do sêmen foi armazenado em tubo de ensaio graduado Falcon de 15 mL e alocado em caixas de isopor contendo gelo em 15 °C (Sanches et al., 2015). Na sequência, foi mensurada a motilidade objetiva selecionando-se individualmente os machos que apresentaram amostra acima de 90% de células móveis para formação de três pools destinados ao processo de congelamento. Em função da quantidade mínima de sêmen necessária para a aplicação dos tratamentos, optou-se por realizar três pools de sêmen de três machos cada, garantindo assim, a quantidade mínima para as análises de motilidade e para a fecundação em larga escala.

Os oócitos coletados foram pesados (206,75±81,94 g) e selecionados 20 g de uma única fêmea (213,40 g), selecionada pela melhor qualidade dos oócitos, para uso na fertilização e obtenção de dados das fecundidades absoluta (399.224 oócitos) e relativa (405 oócitos/g de fêmea) que se apresentaram dentro dos padrões observados para a espécie (Godinho e Godinho, 1986; Romagosa et al., 1990). Dessa porção, foram retiradas subamostras de 0,1 g para contagem e estimativa do número de oócitos a serem fecundados, com base no cálculo da dose inseminante.

2.3. Delineamento experimental

Utilizou-se um delineamento experimental em blocos casualizados, composto por quatro tratamentos (métodos de congelamento em isopor®, dry shipper, geladeira e freezer) e três pools de sêmen coletados de nove machos individuais (bloco), criopreservados na combinação dos crioprotetores metanol 10% e frutose 5,0% – Synth® (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos aplicados para criopreservação espermática de pacu, *P. mesopotamicus*

Tratamentos	Métodos de congelamento	Crioprotetor	Bloco
T1	Isopor	Metanol 10% + Frutose 5,0%	Pool 1
T2	Dry Shipper		
T3	Geladeira		
T4	Freezer		
T1	Isopor		Pool 2
T2	Dry Shipper		
T3	Geladeira		
T4	Freezer		
T1	Isopor		Pool 3
T2	Dry Shipper		
T3	Geladeira		
T4	Freezer		

2.4. Criopreservação espermática

Para o congelamento das amostras (Figura 1), o material seminal dos três “pools” foi diluído individualmente em solução crioprotetoras (pH 7,2±0,1) composta por 10% de metanol, e 5,0% de frutose – Synth® diluída em água destilada, na proporção de 1:9 (sêmen:solução crioprotetora). Em seguida, o material foi envasado em criotubos de 2,0 mL (Kasvi®) por tratamento, com tempo de equilíbrio de 15 minutos em temperatura ambiente (15°C), dividido em globlets e alocado em racks.

As amostras foram então divididas em diferentes formas de congelamento; as temperaturas aferidas com auxílio de termômetro e o congelamento realizado em quatro tratamentos. No tratamento 1, as amostras foram submetidas à criopreservação em vapor de nitrogênio, utilizando uma caixa de isopor® (41 × 26 × 34 cm) posicionada sobre uma estante de aço, a uma altura de 3 cm, durante 10 minutos, a -185 °C. No tratamento 2, a criopreservação foi realizada em dry shipper por 60 minutos, à temperatura de -170 °C.

No tratamento 3, as amostras foram inicialmente mantidas em geladeira por 10 minutos (4 °C), posteriormente acondicionadas em freezer por 30 minutos a -14 °C e, em seguida, transferidas para dry shipper por 60 minutos a -170 °C. No quarto e último tratamento, as amostras permaneceram em freezer por 30 minutos a -14 °C, seguidas de criopreservação em dry shipper por 60 minutos a -170 °C. Ao término dos procedimentos, todas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido por 24 horas.

Na sequência, um criotubo de cada tratamento foi retirado individualmente e imerso imediatamente em banho-maria por 120 segundos/60°C para descongelamento. Em seguida, as amostras descongeladas foram submetidas à análise objetiva de motilidade espermática e as que obtiveram melhores resultados de motilidade foram submetidas ao processo de fertilização. Análises pós-descongelamento de concentração, morfologia e parâmetros cinéticos do espermatozoide foram mensurados.

A fim de garantir a máxima fertilidade, as amostras descongeladas foram submetidas às análises do percentual de motilidade e concentração espermática para estimativa da proporção padrão de espermatozoides móveis por oócito (dose inseminante) destinada ao processo de fertilização (Sanches et al. 2011b). Análises de alterações morfológicas e cinética espermática foram realizadas.

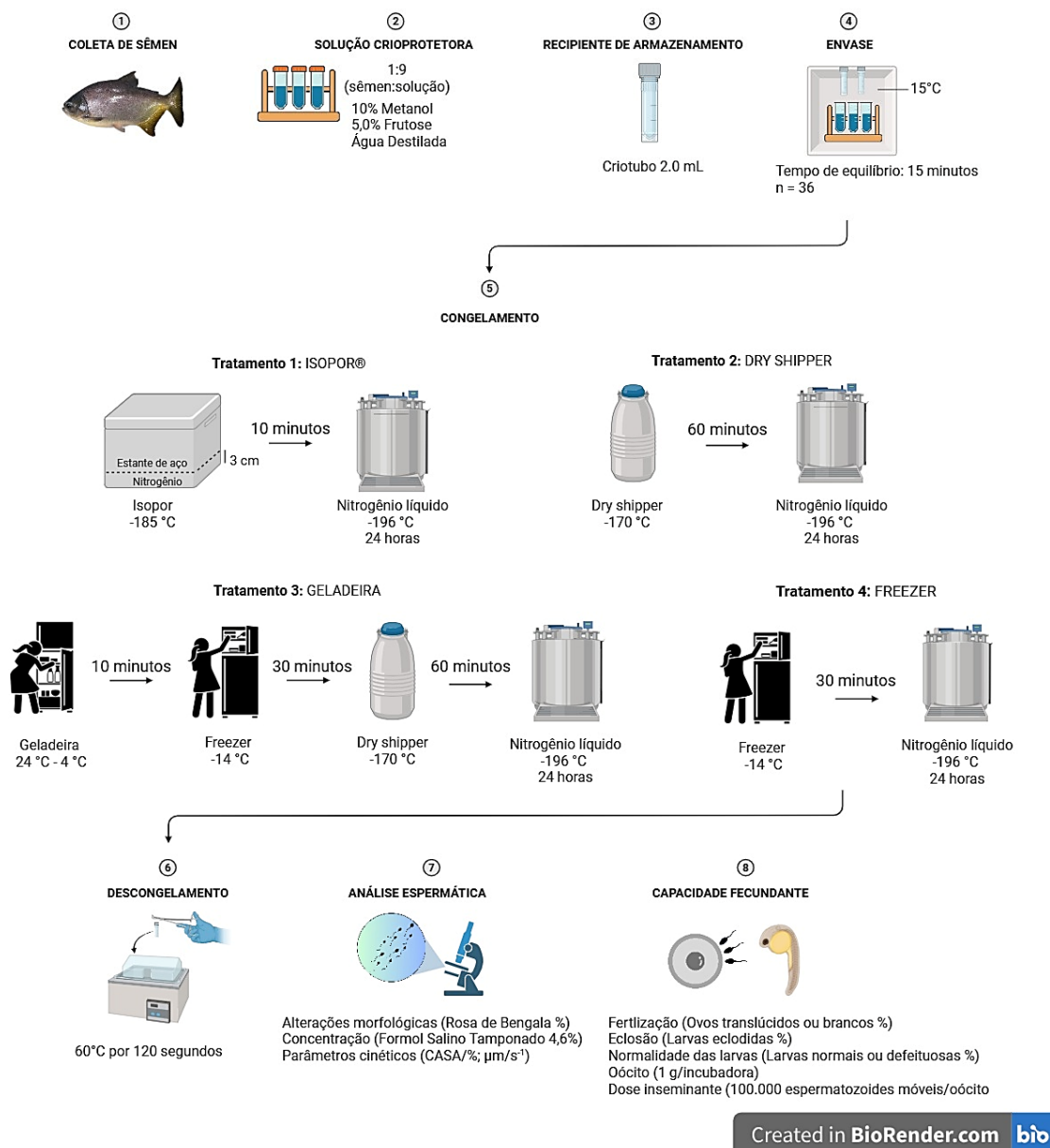


Figura 1. Esquema resumido da metodologia empregada durante o processo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*.

2.5. Análise espermática

A concentração espermática foi determinada por contagem celular em câmara hematómica de Neubauer, conforme Sanches et al. (2011a), seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) para sêmen de mamíferos. As amostras foram fixadas em formol salino tamponado a 4,6% na diluição de 1:1000 μL , e as células quantificadas em microscópio de luz trinocular (SolaristBel), com objetiva de 40X.

Para avaliar e quantificar as alterações morfológicas, amostras de sêmen de cada tratamento foram fixadas em formol salino tamponado a 4,6% na diluição de 1:500, com adição de 10 µL de Rosa Bengala (Streit Jr et al., 2004). As lâminas foram preparadas segundo Sanches et al. (2015), com análise de 200 células por campo em microscópio de luz (60X), classificando os espermatozoides em normais ou defeituosos conforme Streit Jr et al. (2009).

A cinética dos espermatozoides criopreservados e frescos (controle) foi analisada por sistema computadorizado com software de código aberto, conforme Wilson-Leedy e Ingermann (2007). A partir de então, foi possível multiplicar a média das taxas de motilidade pela concentração espermática, resultando na concentração de espermatozoides móveis por mL.

Para o processo de ativação (1:700 - sêmen: água destilada), com auxílio de uma pipeta (µL), as amostras foram rapidamente inseridas em uma câmara de Neubauer espelhada disposta em um microscópio de luz trinocular (SolaristBel) em objetiva 10x contendo câmara para gravação dos vídeos (100 fps - Basler acA640-120gc), conectada ao computador (CPU Intel Core i5 © 1,6 GHz, 8 GB de Ram) com sistema operacional Microsoft Windows 10©. As análises foram realizadas 5 s pós-ativação (0,25 s - 25 frames), conforme procedimentos detalhados por Sanches et al. (2010; 2013) por meio do software livre ImageJ/*plugin* CASA. Os parâmetros avaliados foram: taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL). Para isso, as configurações mínimas para garantir motilidade espermática no plugin CASA foram: VSL=9, VAP=12, VCL=25, adaptadas de Neumann et al. (2013).

2.6. Capacidade fecundante

Foi considerada como uma unidade experimental uma peneira de polipropileno (Ø: 6 cm; malha: 0,5 mm) contendo um volume de 1 g de oócito. Após a indução hormonal, uma amostra de 40 g de oócitos de uma fêmea foi coletada e destinada ao processo de fertilização. Os oócitos foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e três repetições (pools), utilizando-se sêmen criopreservado, tratamento controle composto por um “pool” de sêmen de três machos não congelados, em triplicata (n=39) aos quais foram fertilizados com a respectiva dose inseminante estimada em 100.000 espermatozoides móveis por

oócito e ativadas com 5 mL da solução de frutose (2,5%). As unidades experimentais foram distribuídas aleatoriamente em uma estrutura flutuante previamente instalada em uma caixa d'água de 500 L. Os ovos mantiveram-se em renovação de água contante até o momento da eclosão das larvas.

Para a estimativa das taxas de fertilização, oito horas após a fertilização (fechamento do blastóporo – 24,5 °C) (Weber et al., 2012; Amorim et al., 2009), os ovos de todas as incubadoras ($127,0 \pm 37,0$ ovos/peneira) foram retirados individualmente e classificados. Para a classificação, consideraram-se como ovos fertilizados (OF) (translúcidos e com desenvolvimento embrionário normal) e não fertilizados (NF) (opacos, brancos ou com embrião defeituoso), avaliados por meio da fórmula: $TF (\%) = 100 * (OF / (OF + NF))$.

A eclosão das larvas ocorreu aproximadamente 18 horas após a fertilização e para estimativa das taxas de eclosão (TE) das incubadoras todas as larvas (LA) de cada unidade experimental (peneiras) contabilizadas em estereomicroscópio binocular (objetiva de 10X) e calculadas através da fórmula: $TE (\%) = 100 * (LA / \text{Número total de ovos de cada incubadora})$. As larvas foram classificadas em relação à sua morfologia, as normais (LN) aquelas que não apresentaram nenhum tipo de alteração morfológica; e as defeituosas (LD), as que apresentaram alterações ou deformidades, como alterações na nadadeira caudal e dificuldade na movimentação, avaliadas pela fórmula: $LN (\%) = 100 * (LN / (LN + LD))$.

2.7. Análise estatística

Utilizou-se um delineamento experimental em blocos casualizados composto por quatro tratamentos (métodos de congelamento) e três pools de sêmen (bloco) por meio do software Statistica®. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância de efeitos principais (*main effect* ANOVA) a 5% de significância. Em caso de efeito dos tratamentos, foi aplicada análise de comparação de médias de Duncan ao mesmo nível. Teste de Dunnett foi empregado especialmente para comparar cada média dos tratamentos criopreservados em diferentes métodos de congelamento com a média do tratamento controle (sêmen fresco), individualmente.

3. Resultados

As médias dos parâmetros do sêmen fresco referentes aos “pools” utilizados estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros do sêmen fresco (pools) de *P. mesopotamicus* em 5 segundos pós-ativação

Parâmetros	Sêmen fresco			
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool (fertilização)
Volume (mL)	9,33 $\pm$ 2,08	9,50 $\pm$ 4,77	8,83 $\pm$ 0,76	8,05 $\pm$ 0,35
Concentração ($\times 10^9$ spz mL⁻¹)	40,66 $\pm$ 1,15	51,85 $\pm$ 0,58	52,75 $\pm$ 1,73	49,53 $\pm$ 2,52
Motilidade (%)	88,56 $\pm$ 4,40	99,22 $\pm$ 0,77	100,00 $\pm$ 0,00	95,68 $\pm$ 5,80
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	206,76 $\pm$ 27,64	223,51 $\pm$ 15,03	228,59 $\pm$ 16,25	225,48 $\pm$ 23,27
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	146,22 $\pm$ 18,15	168,48 $\pm$ 9,47	178,48 $\pm$ 12,95	167,94 $\pm$ 21,66
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	121,00 $\pm$ 14,90	139,28 $\pm$ 8,17	147,39 $\pm$ 10,35	138,76 $\pm$ 17,72

3.1. Cinética espermática

A criopreservação resultou na diminuição da motilidade e das velocidades espermáticas quando comparado ao sêmen fresco. Para os parâmetros de cinética espermática, não foi observado efeito significativo das médias entre os pools. Todos os tratamentos criopreservados diferiram do controle (sêmen fresco), que apresentou os maiores valores. Entretanto, a motilidade e as velocidades espermáticas diferiram significativamente entre os métodos de congelamento ($p < 0,05$), com o dry shipper apresentando as maiores médias e o isopor as menores. Para a motilidade (Figura 2A), os tratamentos por freezer e geladeira não diferiram entre si ($p > 0,05$). Quanto a VCL (Figura 2B), VAP (Figura 2C) e VSL (Figura 2D), os métodos apresentaram comportamentos semelhantes, sendo que o tratamento por geladeira não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) nem do dry shipper nem dos tratamentos por freezer e isopor.

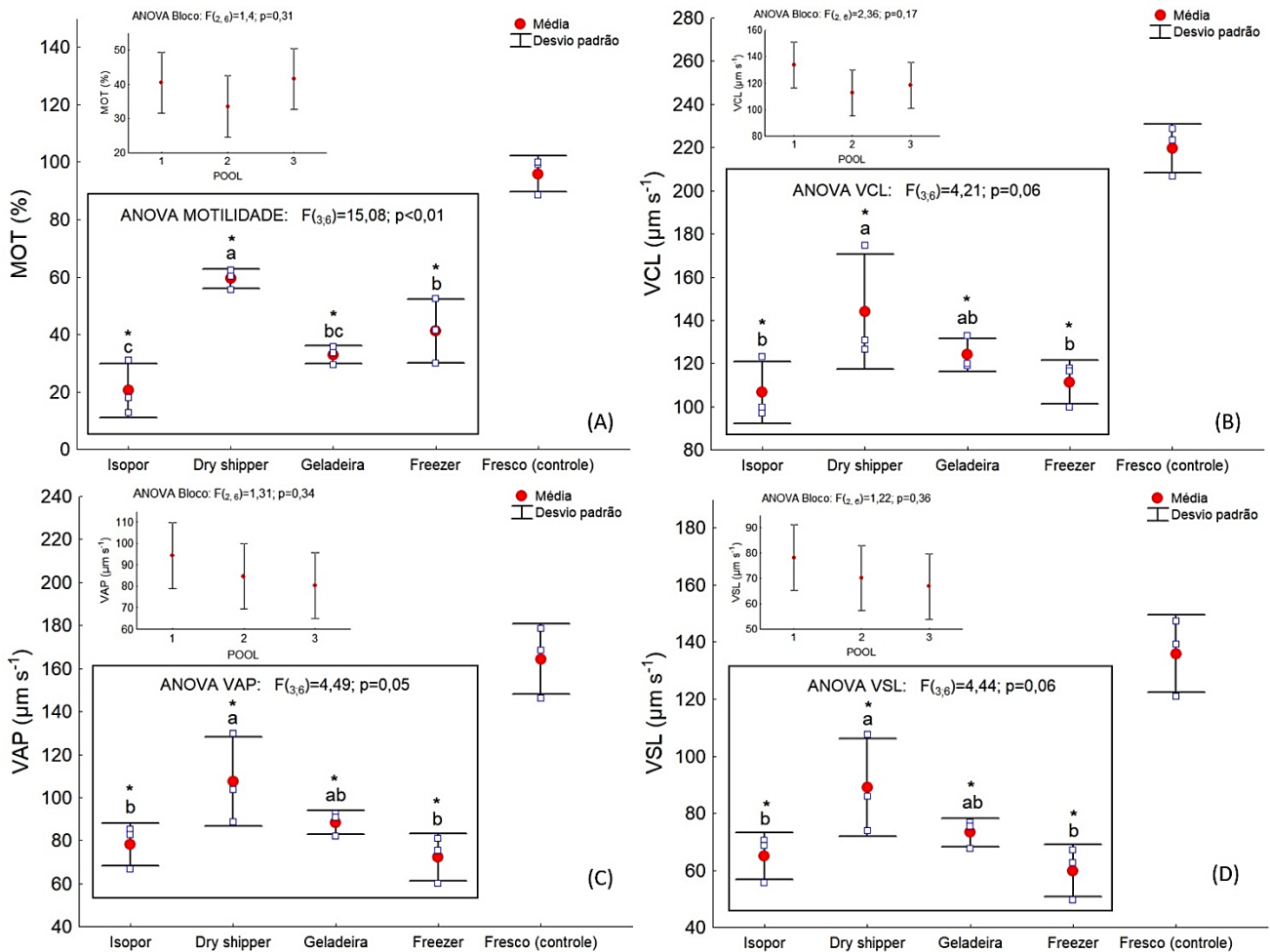


Figura 2. Parâmetros cinéticos de (A): taxas de motilidade (MOT); (B): Velocidade curvilinear (VCL); (C): Velocidade média de deslocamento (VAP) e (D): Velocidade em linha reta (VSL) obtidos por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides criopreservados de três “pools” (blocos) de sêmen de *P. mesopotamicus*, sendo os diferentes métodos de congelamento considerados como tratamentos e o sêmen fresco como controle. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Asteriscos (*) representam diferença ($p<0,05$) de cada tratamento comparados individualmente ao fresco (controle) de acordo com teste de Dunnett.

3.2. Alterações morfológicas

Para o percentual de alterações morfológicas, não foi observado efeito significativo das médias entre os pools ($p>0,05$). Entretanto, houve diferença entre os métodos de congelamento ($p<0,05$), evidenciando influência sobre a integridade morfológica dos espermatozoides após a criopreservação. Todos os tratamentos criopreservados diferiram do controle (sêmen fresco), que apresentou os maiores valores de espermatozoides normais. O método por dry shipper e freezer apresentaram maior percentual de

espermatozoides normais (Figura 3A), não diferindo entre si ($p>0,05$). Os métodos por isopor e dry shipper apresentaram maiores frequências de espermatozoides com cauda dobrada (Figura 3B), sem diferença entre si ($p>0,05$), enquanto freezer e geladeira apresentaram maiores percentuais de cauda solta (Figura 3C), também sem diferirem entre si ($p>0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os métodos de congelamento para os percentuais de cauda quebrada/fraturada (Figura 3D), gota citoplasmática (Figura 3D) e cabeça solta (Figura 3E).

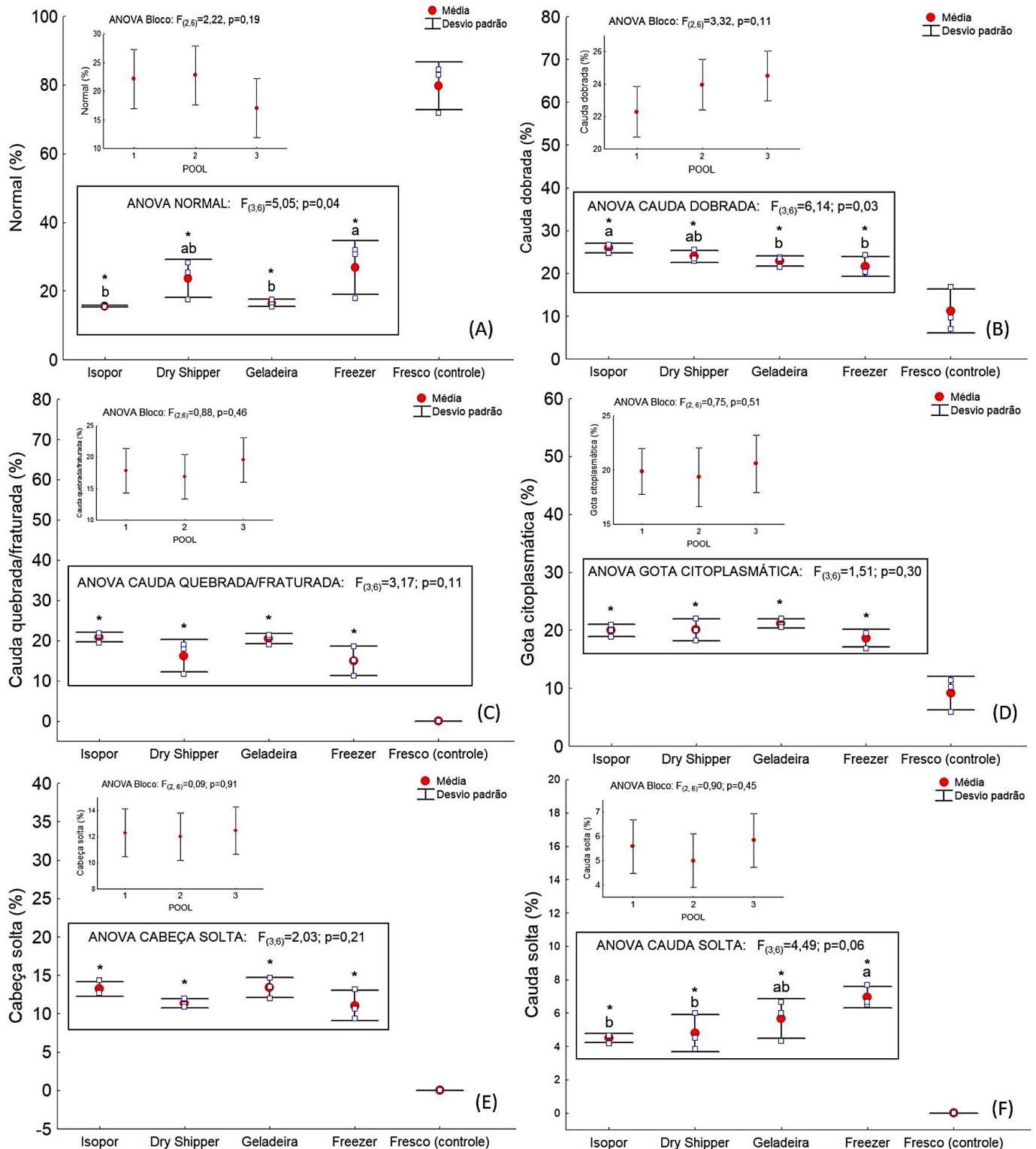


Figura 3. Percentual de alterações morfológicas espermáticas obtidas de três “pools” de sêmen criopreservados de *P. mesopotamicus* utilizando diferentes métodos de congelamento (tratamentos). (A): normal; (B): cauda dobrada; (C): cauda quebrada/fraturada; (D): gota citoplasmática; (E): cabeça solta e (D): cauda solta. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

3.3. Capacidade fecundante

Para a capacidade fecundante, não foi observado efeito significativo das médias entre os pools, métodos de congelamento e quando comparados ao tratamento fresco ($p>0,05$), indicando que os diferentes métodos de criopreservação não influenciaram as taxas de fertilização (Figura 4A), eclosão (Figura 4B) e normalidade das larvas (Figura 4C), mantendo-se a eficiência reprodutiva.

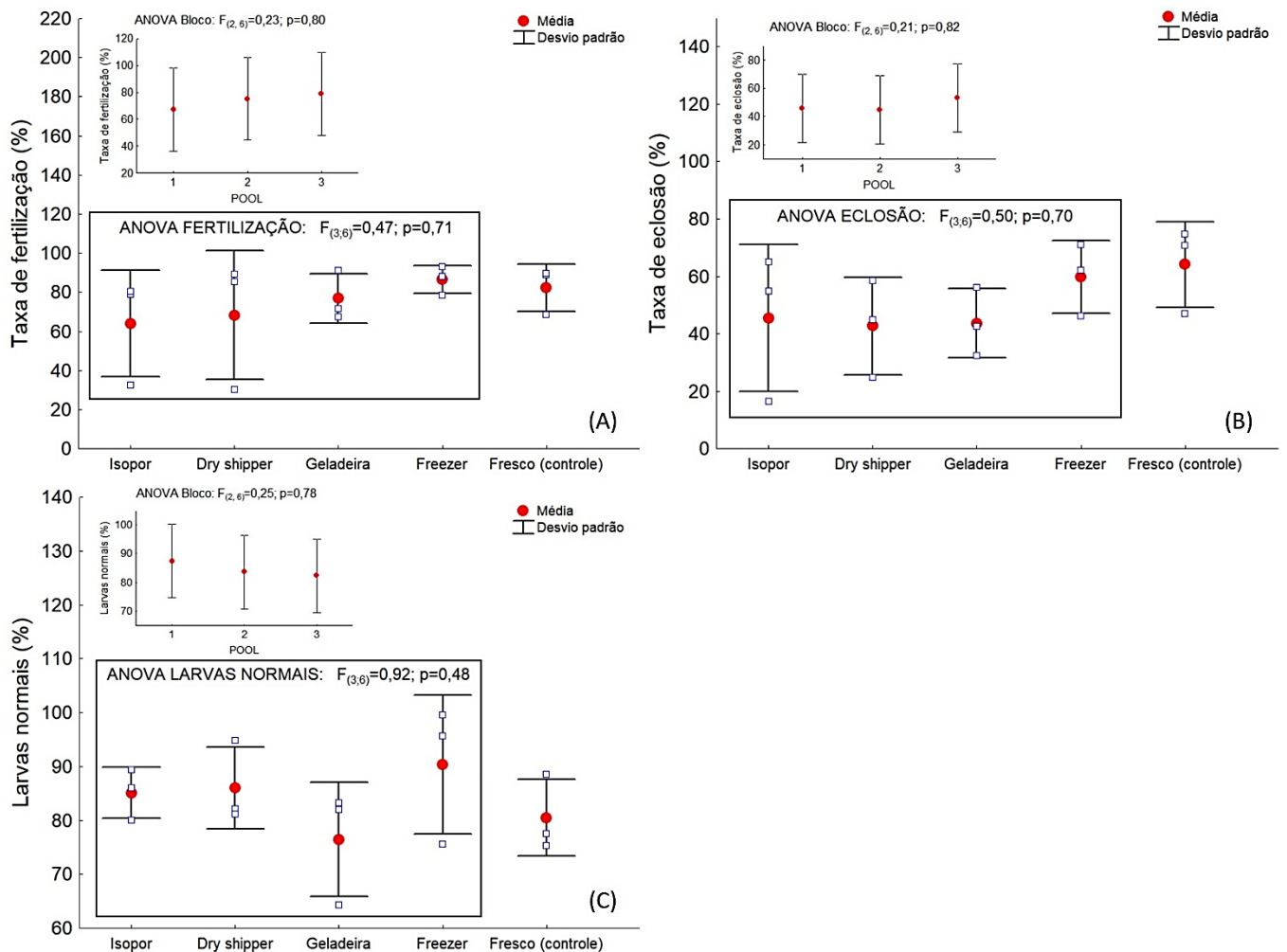


Figura 4. Taxas de fertilização (A), eclosão (B) e larvas normais (C) obtidas a partir de três “pools” de sêmen criopreservados de *P. mesopotamicus*, utilizando peneiras como unidade experimental, sendo os diferentes métodos de congelamento considerados como tratamentos e o sêmen fresco como controle. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

4. Discussão

No experimento conduzido, a utilização de distintos métodos de congelamento na criopreservação resultou em uma redução da motilidade espermática, assim como já observados por Streit Jr et al. (2009) e Spica et al. (2024) para a mesma espécie. Esse processo envolve uma série de alterações biológicas decorrentes de estresses físico-químicos que afetam diretamente a viabilidade e a funcionalidade celular, onde a formação de gelo extracelular promove o aumento da concentração de solutos no meio, induzindo a saída de água da célula e resultando em desidratação e redução do volume celular (Muldrew e McGann, 1990; Hammerstedt et al., 1990). A transição de fase dos fosfolípidios da membrana plasmática durante o resfriamento compromete a fluidez e a organização da bicamada lipídica, afetando proteínas de membrana e canais iônicos essenciais para a ativação da motilidade espermática (Parks e Graham, 1992).

Nessas condições, um pico de temperatura pode provocar danos significativos às estruturas celulares dos espermatozoides, incluindo o núcleo, as mitocôndrias, a membrana plasmática e o flagelo (Lahnsteiner et al., 1992; Zhang et al., 2003; Xin et al., 2020). Assim, a qualidade espermática pós-descongelação depende da capacidade de manutenção da integridade de membranas, do equilíbrio osmótico e da preservação das estruturas responsáveis pela motilidade e pela fecundação.

O método de congelamento *dry shipper* apresentou maior desempenho para motilidade ($59,37 \pm 3,39$) e velocidades. Este método já foi testado com sucesso em protocolos de criopreservação de diversas espécies de peixes Characiformes e é o mais utilizado em relação aos equipamentos para redução da temperatura no processo de criopreservação espermática (Salmito-Vanderley et al., 2014). Os métodos alternativos (geladeira e freezer) também apresentaram desempenho satisfatório tanto para os parâmetros de motilidade respectivamente obtidos ($32,93 \pm 3,23$ e $41,27 \pm 11,15$) e velocidades, quanto para a utilização dos três diferentes “pools”. Resultados semelhantes já foram relatados para o sêmen de *P. mesopotamicus* mantido por até 30 horas em refrigerador doméstico (Lima et al., 1989), embora, nesse estudo, não tenham sido informados os índices de motilidade.

A eficiência da criopreservação espermática está diretamente relacionada à interação entre o tipo e a concentração do crioprotetor e a velocidade de congelamento empregada, uma vez que ambos modulam os mecanismos de formação de gelo e desidratação celular (Mazur, 1984; 2004). O metanol é um crioprotetor permeável que

apresenta cinética de difusão rápida, considerados substâncias com alta solubilidade em água e de baixo peso molecular capazes de penetrar a membrana celular e desempenhar sua ação crioprotetora por todo o citoplasma e organelas (Hubálek, 2003) reduzindo a formação de cristais de gelo intracelulares e os danos associados à desidratação (Watson, 2000).

Para tanto, em velocidades de congelamento mais lentas, como as obtidas em sistemas de geladeira ou freezer, ocorre maior tempo para saída de água da célula, favorecendo a desidratação e reduzindo a formação de gelo intracelular, porém aumentando o risco de danos por efeito de solução, onde nesse cenário, a ação do crioprotetor é fundamental para equilibrar o fluxo osmótico e preservar a integridade estrutural da célula (Mazur, 2004; Watson, 2000). Por outro lado, métodos que promovem resfriamento mais rápido, como o uso de caixas de isopor com vapor de nitrogênio ou sistemas do tipo dry shipper, reduzem o tempo de desidratação celular e diminuem o risco de formação de gelo intracelular, sendo essencial a presença de crioprotetores permeáveis com rápida difusão para evitar a nucleação de cristais (Cabrita et al., 2010; Tiersch, 2011). Dessa forma, a escolha do crioprotetor deve ser ajustada ao método de congelamento empregado, seja em isopor, dry shipper, geladeira ou freezer, de modo a otimizar a taxa de resfriamento e minimizar os danos celulares, refletindo diretamente na manutenção da motilidade espermática e da capacidade de fertilização após a descongelação (Viveiros e Godinho, 2009).

Viveiros et al. (2009; 2012) e Maria et al. (2006) demonstraram que, apesar da eficiência do metanol em diferentes espécies de peixes, sua atuação depende da compatibilidade entre a taxa de resfriamento e a cinética de difusão do crioprotetor. Nesse contexto, a utilização do isopor por aproximadamente 10 minutos a $-185\text{ }^{\circ}\text{C}$ pode ter promovido um resfriamento inicial excessivamente rápido, reduzindo o tempo disponível para desidratação celular adequada e favorecendo a formação de gelo intracelular. Assim, a combinação entre metanol e um sistema de congelamento pouco controlado pode resultar em menor qualidade espermática pós-descongelamento, indicando que ajustes na taxa de resfriamento ou no tempo de equilíbrio são essenciais para otimizar a criopreservação do sêmen de pacu.

Para as alterações morfológicas a criopreservação com método de congelamento por dry shipper e freezer resultaram em taxas de espermatozoides normais superiores aos demais tratamentos, obtendo médias de $(23,67 \pm 5,52)$ e $(26,83 \pm 7,82)$, respectivamente. Resultados inferiores aos obtidos por Teodozia et al. (2020), que verificaram para a

mesma espécie percentuais de $40,36 \pm 8,35$ de espermatozoides normais utilizando dry shipper e $45,37 \pm 6,72$ utilizando metodologia adaptada em freezer ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$). O estudo apresentou baixo percentual de anormalidades espermáticas em relação aos espermatozoides normais. O baixo percentual de anormalidades espermáticas não influenciou as taxas de motilidade e fertilização no presente experimento, fator que pode ser explicado por Cosson et al. (1999), que relataram que o aumento de anormalidades pode reduzir a motilidade e, conseqüentemente, a taxa de fertilização devido a alterações estruturais que comprometem o funcionamento do aparato flagelar responsável pela locomoção.

A motilidade e velocidades dos espermatozoides são os principais parâmetros empregados para verificar a qualidade do sêmen voltada à fecundação (Gallego et al., 2018), os quais estão relacionados diretamente com a capacidade fertilizante do sêmen (Viveiros et al., 2010). No presente estudo foi aplicada uma dose calculada de inseminante que consiste no número de espermatozoides móveis por oócito, a fim de garantir uma máxima fertilidade e uma melhora significativa nas taxas de fertilização, visto que uma dose excessiva pode induzir à polispermia e doses reduzidas podem reduzir a probabilidade de encontro de gametas (Shimoda et al., 2007).

Apesar da perda de motilidade durante o processo de criopreservação, a correção da dose inseminante no processo de fecundação ocasionou em altas taxas de fertilidade, sendo fertilização ($73,82 \pm 9,96$), eclosão ($47,87 \pm 8,01$) e normalidade das larvas ($84,46 \pm 5,03$). Este resultado é maior ao encontrado para a mesma espécie por Carolsfeld et al. (2003) que verificaram cerca de $52,8 \pm 15,5\%$ de taxa de fertilização do sêmen criopreservado em um container do tipo dry shipper a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 7 minutos.

A variação observada nos “pools” pode ser devida aos machos utilizados, assim como já vista por Sanches et al. (2013), que afirmam que há uma grande variabilidade no comportamento resultante entre os indivíduos, o que conseqüentemente ocasiona a variação nos parâmetros espermáticos. Dietrich et al. (2017) também afirmam que os fatores que regulam a tolerância do sêmen de carpa à criopreservação podem estar relacionados aos diferentes perfis proteicos do plasma seminal. Alavi e Cosson (2005; 2006) asseguram que essa diferença nas taxas de motilidade pode estar relacionada com a pressão osmótica, pH, osmolalidade e temperatura do plasma seminal.

5. Conclusão

Conclui-se que, em criotubos de 2,0 mL, o congelamento em dry shipper favorece a manutenção da integridade celular e da motilidade espermática de *Piaractus mesopotamicus*, constituindo estratégia adequada para o aperfeiçoamento do protocolo de criopreservação da espécie.

Referências

- ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J. 2004. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1101-1109. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000500001>.
- ALAVI, S. M. H., COSSON, J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, v.30, p.1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004>.
- ALAVI, S. M. H., COSSON, J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v.29, p.101-110. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.021>.
- AMORIM, M. P., GOMES, B. V. C., MARTINS, Y. S., SATO, Y., RIZZO, E., BAZZOLI, N. 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**, v.40, n.2, p.172-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02079.x>.
- BERNARDINO, G.; LIMA, V.A. 1999. Situação da criação de Colossoma e Piaractus no sudeste do Brasil (1988-1991). In: SOUZA, R.H.S. Criação de Colossoma e Piaractus no Brasil. **IBAMA** (Ed), Brasília, p.173-232.
- BORTOLOZZO F.P., BERNARDI M.L., BENNEMANN P.E., WENTZ I. 2008. **Inseminação artificial em suínos**. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Roca. 395p.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology** 26(5), p 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>.
- CALCAGNOTTO, D., DESALLE, R., 2009. Population genetic structuring in Pacu *Piaractus mesopotamicus* across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotrop. Ichthyol.** v7, p.607–616. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000400008>.
- CAROLSFELD, J., GODINHO, H. P., ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B. J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 49, 1998.

- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. 1999. **Ionic factors regulating the motility of fish sperm**. In: GAGNON, C. (Ed.). The male gamete: from basic science to clinical applications. Vienna: Cache River Press, p. 162-186.
- CRISCUOLO-URBINATI, E., KURADOMI, R. Y., URBINATI, E. C., BATLOUNI, S. R. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**. v.78, p.2087-2094.
- DIETRICH, M.A., IRNAZAROW, I., CIERESZKO, A. 2017. Proteomic identification of seminal plasma proteins related to the freezability of carp semen. **J Proteomics**, V.6 p. 162:52-61. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.015>.
- GALLEGO, V., HERRANZ-JUSDADO, J.G., ROZENFELD, C., PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F. 2018. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter **Fish Physiol. Biochem**, V. 44 (6), p. 1457-1467, <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0505-1>.
- GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. **Biologia reprodutiva de peixes**. Revista Brasileira de Biologia, v. 46, n. 4, p. 803–812, 1986.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology** 11, 73–88.
- HUBÁLEK, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p.205-229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4).
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sidra: Banco de Tabelas Estatísticas. Tabela 3940: Produção da aquicultura. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 10 jan. 2026.
- JOMORI, R. K., CARNEIRO, D. J., MARTINS, M. I., PORTELLA, M. C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v.243, p.175-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.034>.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation, **Aquaculture**, V. 103, p. 73-84. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90280-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90280-X).
- LIMA, J.A.F., CASTAGNOLLI, N., FIGUEIREDO, G.M, 1989. **Reprodução, larvicultura e genética**. In: A. HERNANDEZ, ed. *Cultivo de Colossoma*. Bogotá: Red Regional de Entidades y Centros de Acuicultura de America Latina, p. 315-332.
- MARIA, A.N., VIVEIROS, A.T.M., FREITAS, R.T.F., OLIVEIRA, A.V. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish, **Aquaculture**, V. 260, p. 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.011>
- MARIA, A. N., CARNEIRO, P. C. F. 2012. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v.22, p.124-131.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 247, n. 3, p. 125-142, 1984.
- MAZUR, P.. 2004. Principles of cryobiology. In: Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E. (Eds.), **Life in the Frozen State**. CRC Press, Boca Raton, pp. 3–65.
- MULDREW, K., MCGANN, L.E.1990. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophysical Journal** 57, 525–532.
- NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., TOLEDO, C. P. R., SANCHES, E. A. 2013. **Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre**. 1ª ed. Toledo: LATRAAC/UNIOESTE, 86p.

- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 651–659, 2006.
- PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209–222.
- PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2ed. Totowa, NJ: **Humana Press Inc.** v.368, p.39-58, 2007.
- PURDY, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>.
- RESENDE, E. K. de.; MARQUES, D.K.S. **Criopreservação de sêmen de peixe**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAP-2010/57164/1/CT84.pdf>. Acesso em: 15 nov 2025.
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H. M., GUILHERME, M. C. M. 1990a. Fecundidade do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), mantido em confinamento, durante o 1º e 2º período reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 17, p.99-103.
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) = *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, v.86, p.105-110, 1990b. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90225-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90225-C).
- SALMITO-VANDERLEY, S.S.B., PINHEIRO, J.P.S., ALMEIDA, P.S., LOPES¹, J.T., LEITE, L.V. 2014. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, p. 343-350.
- SANCHES, E. A., BAGGIO, D. M., PIANA, P. A., SOUZA, B. E., BOMBARDELLI, R. A. 2011b. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and *in natura* semen preservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.1-6. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>.
- SANCHES, E. A., BOMBARDELLI, R. A., MARCOS, R. M., NEUMANN, G., DE TOLEDO, C. P. R., ROMAGOSA, E. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 153-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02598.x>.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., BAGGIO, D. M., TESSARO, L., BALEN, R. E., BOMBARDELLI, R. A. 2011a. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1163-1167. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., R. Y. OKAWARA, R.Y., CANEPPELE, R. D., BOMBARDELLI, A., ROMAGOSA, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. **Journal of Applied Ichthyology**, v.29, p.1114-1122. <https://doi.org/10.1111/jai.12165>.
- SANCHES, E. A., OKAWARA, R. Y., CANEPPELE, D., NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., ROMAGOSA, E. 2014. Storage of *Steindachneridion parahybae* oocytes at different temperatures. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.262-268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.022>.
- SANCHES, E. A., OKAWARA, R. Y., CANEPPELE, D., TOLEDO, C. P. R., BOMBARDELLI, R. A., ROMAGOSA, E. 2015. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae*

- (Steindachner, 1877) throughout 112h of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v.31, p.79-88. <https://doi.org/10.1111/jai.12728>.
- SEABRA DE SOUZA, Ana Regina. **Protocolo de criopreservação espermática de pacu *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras**. 2022. 81 f. Dissertação de mestrado – Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Jaboticabal, 2022. <http://hdl.handle.net/11449/232498>.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JR., M.V., GODINHO, H.P., YASUI, G.S. 2007. Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the piabanha *Brycon insignis*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.877-882. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000400009>.
- SPICA, L. N., OLIVEIRA, T. S., SILVA, A. F., HERÉDIA-RIBAS, C. M., POVH, J. A., BATLOUNI, S. R., SANCHES, E. A. 2024. Viability duration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) milt stored under refrigeration. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e287330. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.287330>.
- STREIT JR., D. P., DE OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO, R. P., SIROL, R. N., DE MORAES, GALO, G. V., DIGMAYER, J. M. 2009. Motility, vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 159-167.
- STREIT JR, D.P., MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., POVH, J. A., SOUZA, E. D., OLIVEIRA, C.A.L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 2, p. 157–162.
- STREIT, D.P.; RODRIGUES, R.B; SANCHES, E.A; POVH, J.A; SIQUEIRA-SILVA, D.H; VASCONCELOS, A.C.N; ZHANG, T. Sperm Cryopreservation Protocols for Neotropical South American Species. In: STREIT, Danilo P.; ZHANG, Tiantian; Paredes, Stefania (Org.). **Cryobiology for South American Neotropical Fish Species**, [s. l.]: CRC Press, 2024. p. 193-219.
- TEODOZIA, E. R. P., ARAÚJO, M. S. O., LOPES, J. T., MONTENEGRO, A. R., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. 2020. Semen cryopreservation in *Piaractus mesopotamicus*: the effect of different diluents and freezing equipment. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 51, n. 2. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039>.
- TIERSCH, T. R. Cryopreservation in aquatic species. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 19–26.
- TIERSCH, T.R., 2011. Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), **Cryopreservation in Aquatic Species**, 2nd ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 646–671.
- URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D., 2006. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, p. 225–255. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000300010>.
- VIVEIROS, A.T.M., GODINHO, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry** 35, 137–150.
- VIVEIROS, A.T.M., MARIA, A.N., AMARAL, T.B., ORFÃO, L.H, ISAU, Z.A., VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. 2012. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, 43: 546-555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02860.x>.
- VIVEIROS, A. T. M., NASCIMENTO, A. F., ORFÃO, L. H., ISAU, Z. A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm

- cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v.74, p.551-556. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.018>.
- WATSON, P. F. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 481-492, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).
- WEBER, A. A.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. 2012. Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae). **Zygote**, Cambridge, v.21, n.2, p.198-202. <https://doi.org/10.1017/S096719941200007X>.
- 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**, v.67, p.661-672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>.
- XIN, M., NIKSIRAT, H., SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A., SIDDIQUE, M.A.M., STERBA, J., BORYSHPOLETS, S., LINHART, O. 2020. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. *Aquaculture*, v. 12(2), p. 909 – 924. <https://doi.org/10.1111/raq.12355>.
- YANG, H.& TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 149, p. 224-232, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.005>.
- ZHANG, Y.Z., ZHANG, S.C., LIU, X.Z., XU, Y.Y., WANG, C.L., SAWANT, M.S., LI, J., CHEN, S.L. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology, **Theriogenology**, V. 60, p. 989-996. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00097-9).

CAPÍTULO III – Artigo

É possível produzir híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) utilizando sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*?

RESUMO

Com o desenvolvimento da tecnologia de cruzamento de peixes, a criopreservação espermática pode desempenhar um papel crucial na produção de espécies híbridas, que busca elevar os rendimentos produtivos ao ponto de vista comercial que objetiva produzir animais com melhor desempenho específico. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da criopreservação sobre o desempenho reprodutivo de *Piaractus mesopotamicus* em cruzamento intergenérico com *Colossoma macropomum*, por meio dos índices de fertilização, desenvolvimento embrionário e normalidade larval. Para o congelamento, utilizou-se três pools de sêmen provenientes de nove machos individuais, diluídos em metanol 10% e frutose 5,0% como crioprotetores, na proporção de 1:9 (sêmen:solução), criotubos 2,0 mL como recipiente de armazenamento do sêmen e criopreservados em dry shipper e nitrogênio líquido. Para a fertilização, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos, o sêmen criopreservado proveniente dos três “pools”, tratamento controle composto por um “pool” de sêmen fresco e três repetições, em triplicata. Os parâmetros cinéticos espermáticos diferiram significativamente ($p < 0,01$) entre os tratamentos, com valores maiores no sêmen fresco. Observou-se maior proporção de espermatozoides normais no tratamento fresco. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre o uso de sêmen fresco e sêmen criopreservado nas taxas de fertilização e eclosão. Para larvas normais houve desempenho inferior no tratamento com sêmen criopreservado. Conclui-se que o protocolo utilizando tubos criogênicos de 2,0mL possibilita a produção de larvas do híbrido tambacu a partir de sêmen criopreservado de *Piaractus mesopotamicus* de forma satisfatória e pode ser aplicado em escala comercial.

Palavras-chave: Aquicultura, reprodução, espécie nativa, congelamento, sêmen

ABSTRACT

With the development of fish crossbreeding technology, sperm cryopreservation can play a crucial role in the production of hybrid species, aiming to increase productive yields to a commercial standpoint and produce animals with better specific performance. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of cryopreservation on the reproductive performance of *Piaractus mesopotamicus* in intergeneric crosses with *Colossoma macropomum*, through fertilization indices, embryonic development, and larval normality. For freezing, three pools of semen from nine individual males were used, diluted in 10% methanol and 5.0% fructose as cryoprotectants, in a 1:9 ratio (semen:solution), 2.0 mL cryotubes as semen storage containers, and cryopreserved in a dry shipper and liquid nitrogen. For fertilization, a completely randomized design was used, consisting of four treatments: cryopreserved semen from the three "pools," a control treatment consisting of a "pool" of fresh semen, and three replicates in triplicate. Sperm kinetic parameters differed significantly ($p < 0.01$) between treatments, with higher values in fresh semen. A higher proportion of normal spermatozoa was observed in the fresh treatment. There was no difference ($p > 0.05$) between the use of fresh semen and cryopreserved semen in fertilization and hatching rates. For normal larvae, there was inferior performance in the treatment with cryopreserved semen. It is concluded that the protocol using 2.0 mL cryogenic tubes allows for the satisfactory production of tambacu hybrid larvae from cryopreserved *Piaractus mesopotamicus* semen and can be applied on a commercial scale.

Keywords: Aquaculture, reproduction, native species, freezing, semen

1. Introdução

A criopreservação espermática de peixes é uma técnica utilizada que possibilita o armazenamento do material genético em baixas temperaturas, conservando-se a estrutura, funcionalidade das células e tecidos vivos, tornando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inativos do ponto de vista metabólico (Pegg, 2007, Viveiros et al., 2009, Martínez-Páramo et al., 2009). Além disso, auxilia na fecundação quando há assincronia da maturidade gonadal entre machos e fêmeas; viabiliza o transporte de células; auxilia no estabelecimento de programas de hibridização com peixes de diferentes períodos reprodutivos (Viveiros, 2005; Maria et al., 2009).

Outro ponto relevante é que com o desenvolvimento da tecnologia de cruzamento de peixes, a criopreservação espermática pode desempenhar um papel crucial na produção de espécies híbridas, que busca elevar os rendimentos produtivos ao ponto de vista comercial com produção de proles com maior rusticidade, produtividade e melhor adaptabilidade à criação quando comparado as espécies parentais (Bartley et al., 2001; Botero et al., 2004). Este fator é observado no híbrido interespecífico tambacu (cruzamento da fêmea de *Colossoma macropomum* x macho de *Piaractus mesopotamicus*), ao qual desempenha um papel vital como uma espécie de peixe de água doce economicamente significativa no Brasil, ocupando, juntamente com a tambatinga (outro híbrido) a terceira posição no ranking nacional de produção de peixes (IBGE, 2025). Esse híbrido apresenta características favoráveis à sua produção como, rusticidade, taxa de crescimento superior em relação a seus parentais (Calcagnotto et al., 1999; Porto-Foresti et al., 2008; Hashimoto et al., 2012) e tolerância a baixas temperaturas, o que favorece a produção da espécie em regiões com temperaturas mais frias (Fernandes et al. 2018).

Estudos voltados à criopreservação espermática de *P. mesopotamicus* já foram realizados e apresentam resultados eficazes para a espécie (Carolsfeld et al., 1990; Fogli da Silveira et al., 1990; Bedore, 1999; Streit Jr et al., 2009; Carvalho et al., 2014; Galo et al., 2019), mas nenhum voltado a produção de tambacu com uso de sêmen criopreservado foi executado, sendo este estudo o primeiro relato deste caso.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a possibilidade de formação do híbrido tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*) utilizando sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*.

2. Material e Métodos

2.1. Seleção dos reprodutores

Para o processo de criopreservação, foram selecionados nove machos de *P. mesopotamicus* ($2,45 \pm 0,29$ kg) que liberaram sêmen sob pressão abdominal no sentido encéfalo-caudal. Após a obtenção dos resultados da criopreservação, três fêmeas de *C. macropomum* ($10,27 \pm 1,7$ kg) foram selecionadas para os testes de fecundação, sendo aquelas que apresentaram abdômen dilatado e macio, além de papila genital avermelhada (Romagosa et al. 1990), e por meio da coleta intra-ovárica de uma amostra de oócitos para análise da migração da vesícula germinativa, selecionadas apenas as fêmeas com mais de 60% dos núcleos em processo de migração. Além disso, o sêmen de dois machos adicionais ($3,70 \pm 0,85$ kg) foi utilizado por meio de um “pool” na fecundação como tratamento controle.

Os animais selecionados foram transferidos em laboratório para a realização dos procedimentos experimentais. Os peixes foram alocados em caixas d’água circulares de 500 L com aeração constante, temperatura ($^{\circ}\text{C}$): $23,8 \pm 0,3$; pH: $6,6 \pm 0,4$; oxigênio dissolvido (ppm): $7,8 \pm 1,6$; amônia: $0,1 \pm 0,0$ e, em seguida, submetidos ao protocolo de indução hormonal.

2.2. Indução hormonal e coleta de gametas

Para a criopreservação e a fecundação, os 11 machos foram induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) diluído em solução salina (0,9% NaCl; $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$), em dose única de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$. As fêmeas receberam duas aplicações de EBHC ($0,5$ e $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$), associadas a $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$ de prostaglandina sintética Ciosin®, com intervalo de 12 horas (Criscuolo-Urbini et al., 2012). As aplicações seguiram a ordem de coleta, primeiro os gametas masculinos e depois os femininos, para preservar a viabilidade dos ovócitos (Sanches et al., 2014).

Após cerca de 240 horas-grau, os peixes foram submetidos à extrusão (Romagosa, 1990b; Bernardino e Lima, 1999). Nos machos, a primeira gota de sêmen foi descartada para evitar contaminação por urina (Marques et al., 2021), e o restante foi coletado em tubos de 15 mL e mantido a 15°C (Sanches et al., 2015). Na sequência, foi mensurada a motilidade objetiva selecionando-se individualmente os machos que apresentaram

amostra acima de 90% de células móveis para formação de três pools destinados ao processo de congelamento.

Os oócitos coletados foram pesados ($317,51 \pm 176,26$ g) e selecionados 20 g provenientes de uma única fêmea (455,52 g), escolhida pela melhor qualidade dos oócitos, para a etapa de fertilização e obtenção de dados das fecundidades absoluta (578.510 oócitos) e relativa (51 oócitos/g de fêmea). Amostras de 0,1 g foram utilizadas para contagem e estimativa do número de oócitos a serem fecundados, a partir do cálculo da dose inseminante.

2.3. Criopreservação espermática

Para o congelamento, utilizou-se três pools de sêmen provenientes de nove machos individuais, diluídos em uma solução crioprotetora composta por metanol 10% e frutose 5,0% (Synth®), água destilada como solução diluidora, na proporção de 1:9 (sêmen:solução) (pH $7,5 \pm 0,1$).

Em uma caixa de isopor resfriada a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, o material foi envasado em criotubos de 2,0 mL (Kasvi®), com tempo de equilíbrio de 15 minutos, e em seguida alocados em vapor de nitrogênio em um container criogênico do tipo *Dry shipper* (YDH-8-80/8 litros) a $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante duas horas. Após, os criotubos foram transferidos para um contêiner “tipo líquido” (XT20/40 litros) onde foram armazenados em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por duas horas. Para o descongelamento das amostras, o criotubo de cada tratamento foi retirado individualmente e imerso imediatamente em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 segundos.

A fim de garantir a máxima fertilidade e uma melhora significativa nas taxas de fertilização, as amostras descongeladas foram submetidas às análises do percentual de motilidade ($96,00 \pm 1,80$) e da concentração ($2,40 \pm 0,30 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1}) para estimativa da proporção padrão de espermatozoides móveis por oócito (dose inseminante) destinada ao processo de fertilização (Sanches et al. 2011b). Análises de alterações morfológicas e cinética espermática foram realizadas.

A motilidade dos espermatozoides criopreservados e frescos foi avaliada por método computadorizado com software de código aberto (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). Após o processo de ativação (1:700 - sêmen: água destilada) os vídeos (100fps) foram avaliados em cinco segundos pós-ativação (0,25 s - 25 frames), conforme procedimentos detalhados por Sanches et al. (2010; 2013), por meio do software livre

ImageJ/plugin CASA. Os parâmetros avaliados foram: taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL). Para isso, as configurações mínimas para garantir motilidade espermática no software foram: VSL=3, VAP=10, VCL=15 adaptadas de Neumann et al. (2013).

Para a concentração, o sêmen foi fixado individualmente em solução de formol salino tamponado (4,6%) na proporção de 1:1000 µL. A contagem celular foi realizada em câmara hematómica de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico trinocular (SolaristBel) em objetiva de 40X (Sanches et al. 2011a), e o cálculo seguiu as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) para sêmen de mamíferos.

Para as alterações morfológicas dos espermatozoides, o sêmen foi fixado individualmente na proporção de 1:500 em formol salino tamponado a 4,6%, acrescido de 5 µL do corante Rosa Bengala (Streit Jr et al., 2004). Para a avaliação, duas alíquotas de 10 µL da amostra foram distribuídas sobre lâminas histológicas e processadas conforme Sanches et al. (2015), com análise de 200 células por campo, em triplicata, utilizando microscópio óptico com objetiva de 60X. Os espermatozoides foram classificados como normais ou conforme o grau de defeitos, de acordo com Streit Jr. et al. (2018).

2.4. Análise de fertilidade

Os oócitos foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos, o sêmen criopreservado proveniente dos três “pools”, tratamento controle composto por um “pool” de sêmen de dois machos frescos e três repetições, em triplicata (n=36), fertilizados com a respectiva dose inseminante estimada em 100.000 espermatozoides móveis por oócito e ativados com 5 mL da solução de frutose 2,5%. Foi considerada como uma unidade experimental uma peneira de polipropileno utilizada como incubadora (Ø: 6cm; malha: 0,5 mm) contendo um volume de 0,1 mL de oócito ($127,0 \pm 3,60$). As unidades experimentais foram alocadas aleatoriamente em uma estrutura flutuante previamente instalada em uma caixa d’água de 500 L, sob aeração contínua, garantindo a movimentação constante dos ovos até a eclosão das larvas.

Oito horas após a fertilização, no estágio de fechamento do blastóporo a 24,5 °C (Weber et al., 2012; Amorim et al., 2009), realizou-se a estimativa das taxas de fertilização. Nessa etapa, os ovos de todas as incubadoras foram retirados individualmente e classificados em fertilizados (OF) os translúcidos e com desenvolvimento embrionário normal e não fertilizados (NF) os opacos, esbranquiçados ou com embrião defeituoso. A taxa de fertilização foi calculada pela fórmula: $TF (\%) = 100 \times (OF / (OF + NF))$.

Cerca de 18 horas após a fertilização, ocorreu a eclosão das larvas. Para determinar as taxas de eclosão (TE), todas as larvas (LA) de cada unidade experimental foram retiradas, sedadas com eugenol (10 mg/L) e contadas em estereomicroscópio binocular com objetiva de 10X. A taxa foi calculada pela fórmula: $TE (\%) = 100 \times (LA / \text{número total de ovos de cada incubadora})$. Durante a contagem, as larvas foram classificadas quanto à morfologia em normais (LN), quando não apresentavam alterações, e defeituosas (LD), quando exibiam deformidades ou anormalidades como alterações na nadadeira caudal e dificuldade de movimentação, sendo a proporção de larvas normais obtida por: $LN (\%) = 100 \times (LN / (LN + LD))$.

2.5. Análise estatística

Para as variáveis de cinética espermática e morfologia, as médias dos tratamentos com sêmen fresco e criopreservado foram comparadas por meio do teste *t* de Student, após a verificação dos pressupostos de normalidade, adotando-se nível de significância de 5%.

3. Resultados

Os parâmetros do sêmen fresco referentes aos três pools utilizados estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros do sêmen fresco (pools) de *P. mesopotamicus* em 5 segundos pós-ativação

Parâmetros	Sêmen fresco			
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool (fertilização)
Volume (mL)	8,17 $\pm$ 0,76	9,00 $\pm$ 2,00	7,83 $\pm$ 3,00	7,09 $\pm$ 0,10
Concentração ($\times 10^9$ espermatozoides mL ⁻¹)	13,57 $\pm$ 1,06	12,20 $\pm$ 1,97	13,64 $\pm$ 0,47	14,04 $\pm$ 0,79
Motilidade (%)	96,53 $\pm$ 4,38	97,09 $\pm$ 1,63	99,07 $\pm$ 0,43	96,61 $\pm$ 3,22
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	191,99 $\pm$ 9,19	200,31 $\pm$ 4,31	181,33 $\pm$ 16,30	198,68 $\pm$ 5,08
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	139,59 $\pm$ 18,91	165,52 $\pm$ 8,23	141,09 $\pm$ 30,13	163,08 $\pm$ 7,71
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	115,21 $\pm$ 15,54	136,83 $\pm$ 7,17	116,94 $\pm$ 25,05	135,03 $\pm$ 6,51

Os parâmetros cinéticos espermáticos diferiram significativamente ($p < 0,01$) entre os tratamentos, com valores maiores no sêmen fresco, em que a motilidade (MOT) (Figura 1A) e as velocidades VCL (Figura 1B), VAP (Figura 1C) e VSL (Figura 1D) foram reduzidas após a criopreservação, evidenciando a influência da aplicação dessa técnica sobre a movimentação e o desempenho cinético dos espermatozoides (Figura 1). Os parâmetros espermáticos do tratamento fresco apresentaram médias de MOT (%): 97,56 $\pm$ 2,61; VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$): 191,21 $\pm$ 12,65; VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$): 148,73 $\pm$ 22,18 e VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$): 123,00 $\pm$ 18,40. Após a aplicação da técnica de criopreservação, as médias obtidas para a cinética dos espermatozoides foram: MOT (%): 44,57 $\pm$ 11,08; VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$): 127,37 $\pm$ 36,60; VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$): 66,84 $\pm$ 10,95 e VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$): 55,37 $\pm$ 9,16.

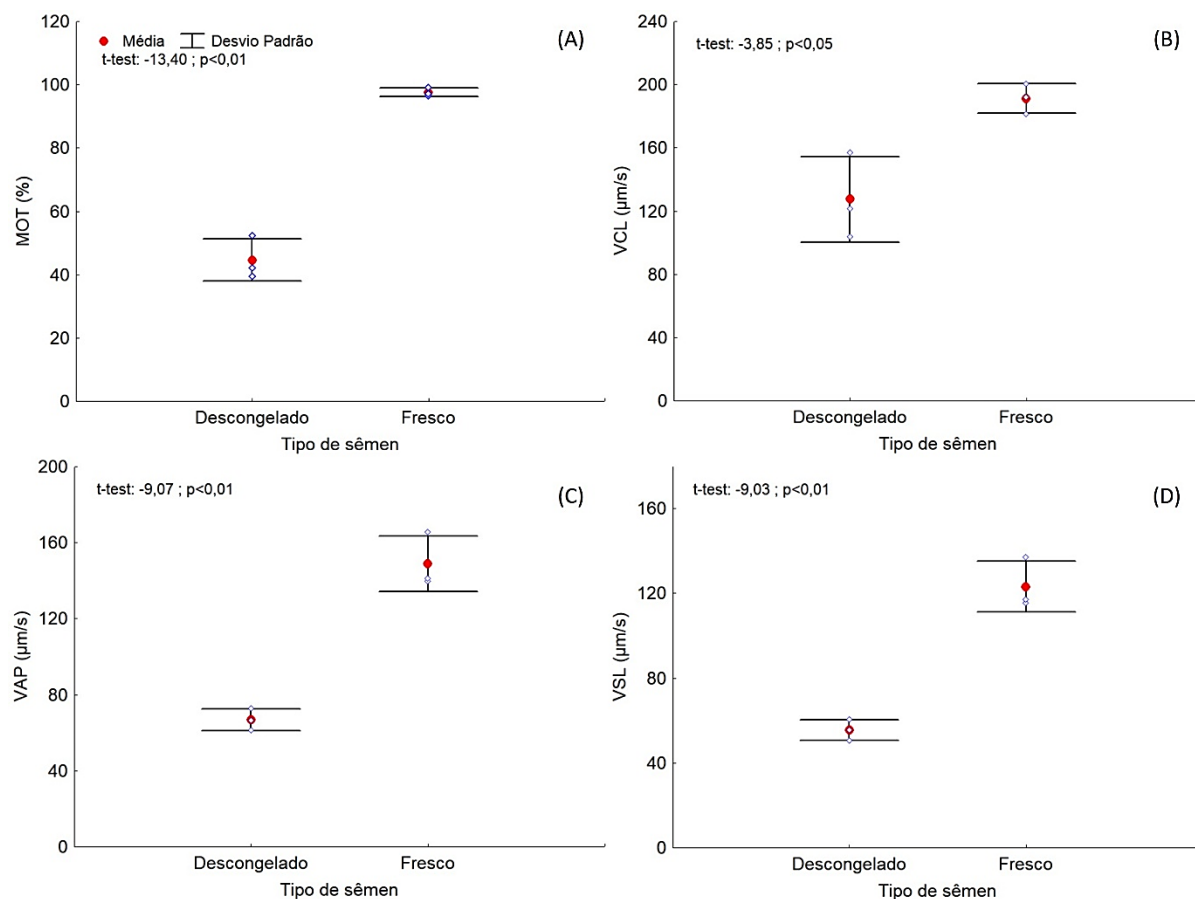


Figura 1. Parâmetros de (A) Motilidade; (B) Velocidade Curvilnear; (C) Velocidade média da trajetória (VAP); (D) Velocidade linear progressiva, obtidos por meio do software livre ImageJ/plugin CASA em 5 segundos pós-ativação, para do sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* com três diferentes “pools”, em comparação ao sêmen fresco.

A análise de alterações morfológicas evidenciou diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o sêmen criopreservado e o fresco em todas as variáveis avaliadas. Observou-se maior proporção de espermatozoides morfolologicamente normais no tratamento fresco, enquanto as amostras criopreservadas apresentaram redução acentuada dessa variável (Figura 2A). Ressalta-se que a criopreservação promoveu aumento significativo nas anomalias espermáticas, com maiores frequências de cauda dobrada (Figura 2B), gota citoplasmática (Figura 2C), cabeça solta (Figura 2D), cauda solta (Figura 2E) e cauda curta (Figura 2F).

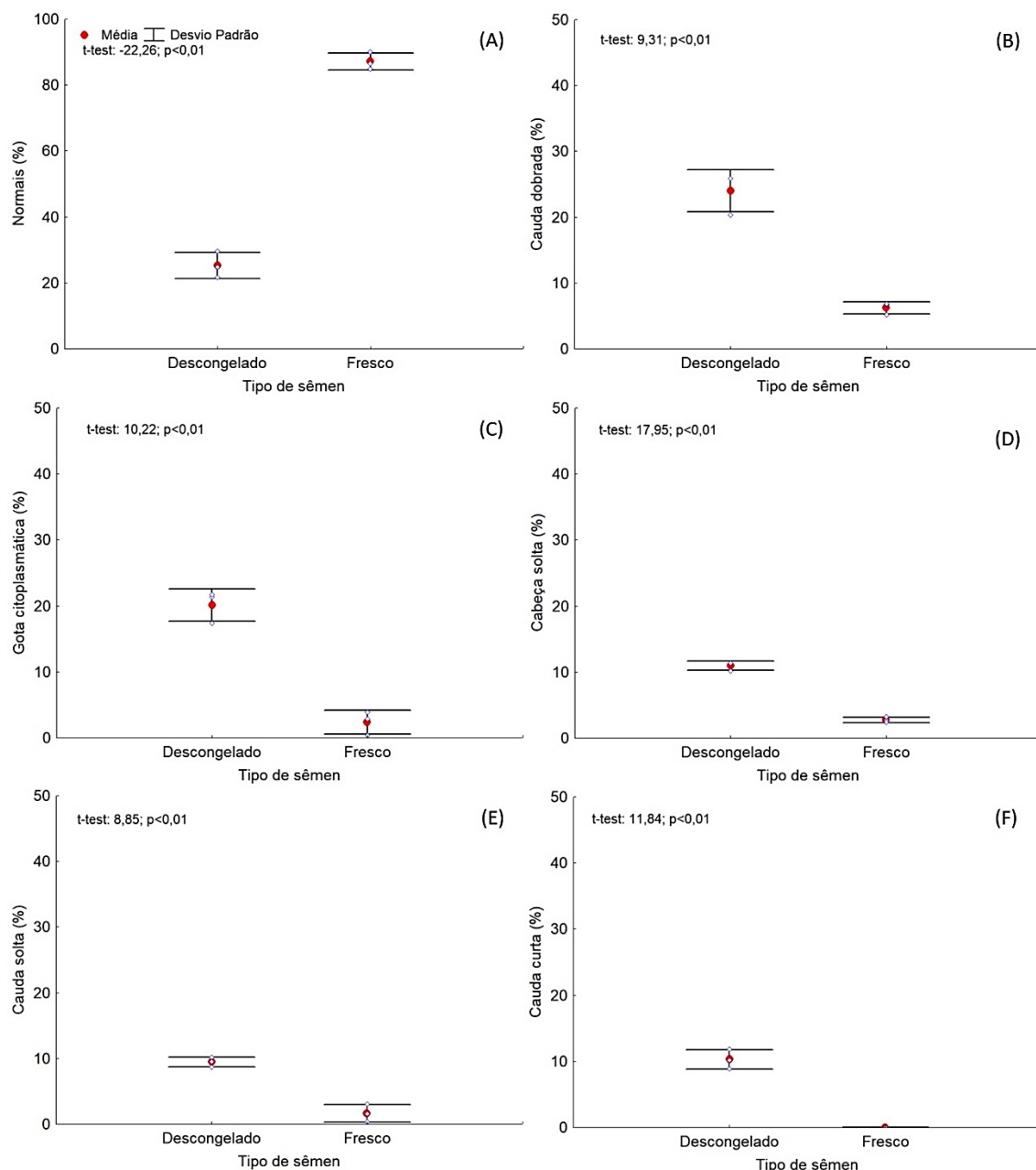


Figura 2. Parâmetros de alterações morfológicas do sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* com três diferentes “pools”, em comparação ao sêmen fresco classificados em (A) Normal; (B) Cauda dobrada; (C) Gota citoplasmática; (D) Cabeça solta; (E) Cauda solta e (F) Cauda curta.

Não houve diferença significativa ($p > 0,01$) entre o uso de sêmen fresco e sêmen criopreservado nas taxas de fertilização (Figura 3A) e eclosão (Figura 3B) observadas. Esses resultados indicam que o processo de criopreservação não comprometeu a capacidade fecundante dos espermatozoides, mantendo sua viabilidade funcional após o descongelamento. Entretanto, para a proporção de larvas normais (Figura 3C), foi observada diferença significativa ($p < 0,01$), com desempenho inferior no tratamento com

sêmen criopreservado, indicando melhor qualidade larval quando utilizada a amostra com sêmen fresco.

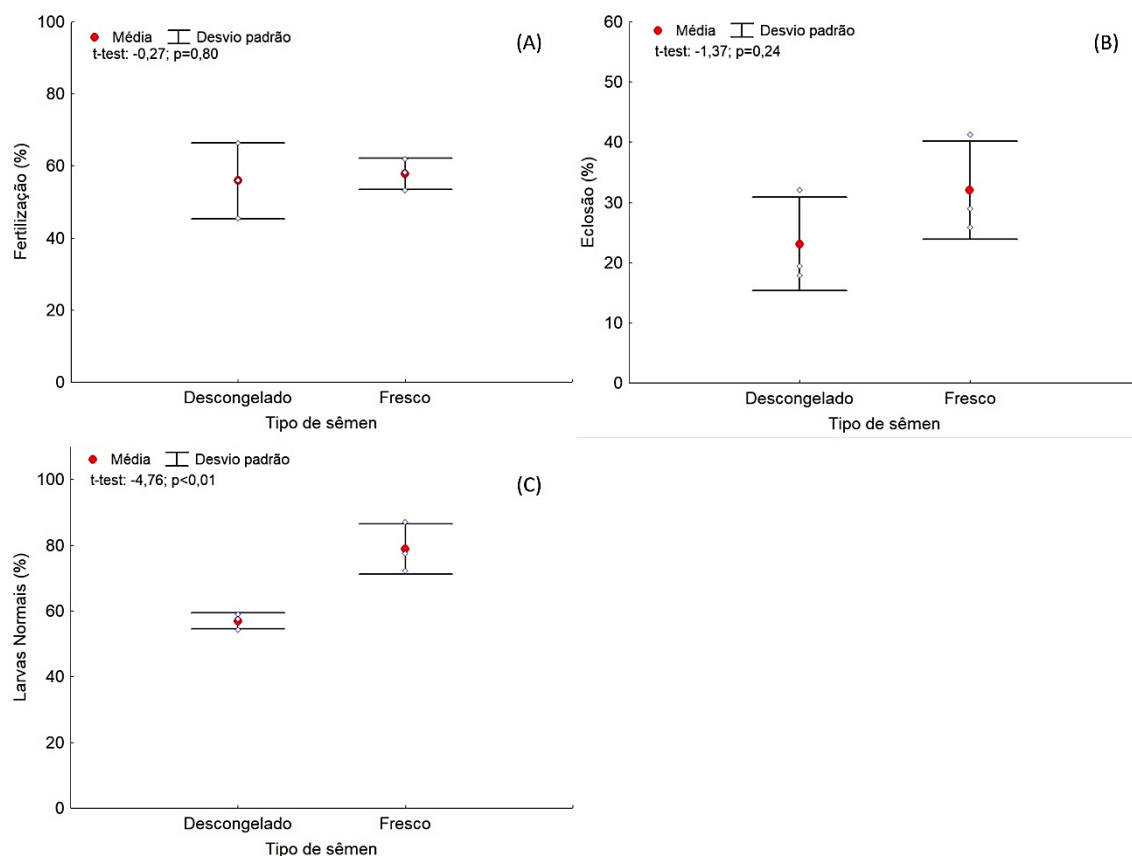


Figura 3. Taxa de fertilização (A), eclosão (B) e larvas normais (C) do sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* com três diferentes “pools”, em comparação ao sêmen fresco aplicando-se teste t-student.

4. Discussão

Apesar de não haver um valor mínimo definido para os parâmetros da cinética espermática dos espermatozoides de peixes que assegure, por si só, a eficácia do sêmen, os resultados observados na maioria dos estudos são adotados como referência e utilizados como indicativo de qualidade seminal. Com isso, os parâmetros espermáticos verificados na avaliação do sêmen fresco neste estudo garantiram a confiabilidade necessária para a realização dos objetivos propostos.

Para os parâmetros de cinética espermática, foi observada uma redução nas taxas de motilidade e velocidades após o processo de criopreservação, que pode ser ocasionada devido a fatores como as diferenças nas características físico-químicas do meio de

ativação e plasma seminal (Morisawa, 2008) e a sensibilidade dos espermatozoides frente a ação dos crioprotetores (Viveiros e Godinho, 2009).

Ainda com essa redução, o presente estudo apresentou médias superiores de motilidade ($44,57 \pm 11,08$), VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$): $127,37 \pm 36,60$; VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$): $66,84 \pm 10,95$ e VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$): $55,37 \pm 9,16$, para o sêmen criopreservado, quando comparadas a estudos elaborados para a mesma espécie (Galo et al., 2019; Teodozia et al., 2020).

Além disso, foram observadas variações dos parâmetros cinéticos entre os diferentes pools. Conforme Bobe e Labbé (2010), machos são diferentes entre si, mesmo pertencentes a mesma espécie, pois apresentam variações genéticas, fisiológicas e reprodutivas que influenciam diretamente o desempenho seminal e o sucesso no processo de fecundação.

Segundo Murgas et al. (2011), a redução da motilidade dos espermatozoides em parte ocorre por uma queda na oferta de energia, que ocorre durante o processo de movimentação. No presente experimento, foi utilizada uma solução composta por 2,5% frutose no processo de ativação do sêmen, o que pode ter influenciado a motilidade e velocidades do sêmen, visto que a frutose possui capacidade de fornecer substrato energético para as células germinativas masculinas (Adames et al. 2015).

A diminuição na porcentagem de espermatozoides normais e a presença das patologias (cauda curta, cauda dobrada, gota citoplasmática, cabeça e cauda soltas) identificadas para o sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* neste estudo, está diretamente ligada aos processos de criopreservação, que pode provocar desestruturação dos espermatozoides em decorrência de choques térmicos e osmóticos e da formação de cristais de gelo durante o congelamento e o descongelamento (Watson e Morris, 1987). Este fato pode ser corroborado por Streit Jr et al. (2018) em sêmen criopreservado da mesma espécie, que obtiveram $31,50 \pm 12,30$ para espermatozoides morfologicamente normais, $54,60 \pm 7,59$ para anomalias primárias e $13,91 \pm 6,13$ para as secundárias. A porcentagem de anormalidades primárias nos espermatozoides é a principal variável que influencia as taxas de fertilização e eclosão no sêmen fresco ou descongelado (Galo et al., 2019). No presente experimento, o percentual de patologias primárias ocorreu em menor número ($10,28 \pm 2,92$) quando relacionado às patologias secundárias.

A média obtida no presente estudo para fertilização do sêmen fresco do tambacu foi de $57,71 \pm 4,32$, resultado inferior ao obtido por Moraes et al. 2018, que verificaram uma média de $93,00 \pm 1,1$ para a mesma espécie híbrida. Analisando os parâmetros do sêmen criopreservado com a reduzida ocorrência de anomalias primárias e os valores

adequados de cinética espermática, observa-se que o processo de criopreservação não interferiu na taxa de fertilização para esses tratamentos. Ressalta-se ainda, que quando o protocolo empregado neste estudo é comparado a outro protocolo utilizado em outra espécie híbrida (Zeng et al., 2024), os resultados encontrados são superiores e de maior eficiência.

Os resultados obtidos para fertilização mostram que o sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* manteve seu potencial de fertilização, resultando em uma eclosão bem-sucedida, aos quais não apresentaram diferença com o tratamento fresco. Quanto a normalidade das larvas, houve influência da criopreservação, onde, embora a criopreservação mantenha a viabilidade funcional para a fecundação, o processo pode ocasionar alterações subcelulares, como danos à membrana plasmática, ao acrossomo e ao DNA espermático, que não impedem a fertilização, mas podem comprometer o desenvolvimento embrionário subsequente e a qualidade larval (Watson, 2000; Bobe e Labbé, 2010; Herráez et al., 2016).

Este estudo trata-se do primeiro trabalho a utilizar sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* para formação de uma espécie híbrida, além de demonstrar resultados para manutenção da qualidade do sêmen após o descongelamento. Dessa forma, os resultados obtidos fornecem subsídios para sua aplicação em escala comercial.

5. Conclusão

O protocolo utilizando tubos criogênicos de 2,0mL possibilita a produção de larvas do híbrido tambacu a partir de sêmen criopreservado de *Piaractus mesopotamicus* de forma satisfatória e pode ser aplicado em escala comercial.

Referências

- ADAMES, M.S., 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**, V 161, p 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>.
- AMORIM, M. P., GOMES, B. V. C., MARTINS, Y. S., SATO, Y., RIZZO, E., BAZZOLI, N. 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**, v.40, n.2, p.172-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02079.x>.
- BARTLEY, D.M.; RANA, K.; IMMINK, A.J. 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 325-337.
- BEDORE, A.G. 1999. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignianus*)**. Belo Horizonte. 53p. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG).
- BERNARDINO, G.; LIMA, V.A. 1999. Situação da criação de Colossoma e *Piaractus* no sudeste do Brasil (1988-1991). In: SOUZA, R.H.S. Criação de Colossoma e *Piaractus* no Brasil. **IBAMA** (Ed), Brasília, p.173-232.
- BOBE, J., LABBÉ, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 165(3), 535–548.
- BOTERO, M.C.; FRESNEDA, A.; MONTROYA, A.F.; OLIVERA-ÁNGEL, M. 2004. Description of embryonic development of hybrid zygotes obtained by crossing male Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) and female Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 17, n. 4.
- CALCAGNOTTO, D.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. de; BERNARDINO, G.; TOLEDO FILHO, S. de A. 1999. Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. **Aquaculture**, v. 174, p. 51-57.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990. Criopreservação do sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1987. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, 3(único): 1-4.
- CARVALHO, A. F. S., MACHADO, M. R. F., ANDRADE, E. S., MURGAS, L. D. S., ZANGERONIMO, M. G. 2014. Effect of Caffeine Added to the Activating Solution on Sperm Motility of Fresh and Thawed Semen of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, and Curimba, *Prochilodus lineatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.45, n.1, p.75-81. <https://doi.org/10.1111/jwas.12091>.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 49, 1998.
- CRISCUOLO-URBINATI, E., KURADOMI, R. Y., URBINATI, E. C., BATLOUNI, S. R. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**. v.78, p.2087-2094.
- FERNANDES, E.M.; DE ALMEIDA, C.F.; HASHIMOTO, D.T.; LATTANZI, G.R.; GERVÁZ, W.R.; LEONARDO, A.F.; NETO, R.V.R. 2018. Survival of purebred and hybrid

- Serrasalmidæ under low water temperature conditions. *Aquaculture*, 497, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.030>.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A.; GODINHO, H.M.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, 17: 1-13.
- GALO, J. M., STREIT-JUNIOR, D. P., OLIVEIRA, C. A., POVH, J. P., FORNARY, D. C., DIGMAYER, D., RIBEIRO, R. P. 2019. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, n.3, p.438-445. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.182391>.
- HASHIMOTO, D.T.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. 2012. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, n. 2, p. 108-118.
- HERRÁEZ, M. P.; AUSIÓ, J.; DEVAUX, A.; GONZÁLEZ-ROJO, S.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, C.; BONY, S.; SAPERAS, N.; ROBLES, V., PŠENIČKA, M. 2016. Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. **Aquaculture**, v. 472, p. 45–59.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sidra: Banco de Tabelas Estatísticas. Tabela 3940: Produção da aquicultura. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 10 jan. 2026.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; CARVALHO, M. A.; NUNES, J. F. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 293-300.
- MARQUES, L.M., GRACIA, L.F.G., ATEHORTÚA, M.P., RODRIGUES, R.B., TEIXEIRA, N.S., OBERST, E.R., STREIT R, D.P. 2021. Urine, feces, and blood contamination of frozen and fresh tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) sperm. **Cryobiology**, v 102, p 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.07.003>.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., PÉREZ-CEREZALES, S., GÓMEZ-ROMANO, F., BLANCO, G., SÁNCHEZ, J. A., HERRÁEZ, M. P. 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, v.7, p.594-604. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.034>.
- MORAIS, R.M.; SOUTO, C.N.; SILVA, L.A.S.; PÁDUA, D.M.C. 2018. Concentração espermática e fertilização artificial de ovócitos do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 1, p. 144-148.
- MORISAWA, M. 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.362-70. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01126.x>.
- MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, E. S.; VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191.
- NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., TOLEDO, C. P. R., SANCHES, E. A. 2013. **Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre**. 1ª ed. Toledo: LATRAAC/UNIOESTE, 86p.
- PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. v.368, p.39-58, 2007.

- PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T.; ALVES, A.L.; ALMEIDA, R.B.C.; SENHORINI, J.A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F. 2008. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 195-202.
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H. M., GUILHERME, M. C. M. 1990a. Fecundidade do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), mantido em confinamento, durante o 1º e 2º período reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 17, p.99-103.
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H.M. 1990b. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) = *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, v.86, p.105-110. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90225-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90225-C).
- SANCHES, E. A., BAGGIO, D. M., PIANA, P. A., SOUZA, B. E., BOMBARDELLI, R. A. 2011b. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and *in natura* semen preservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.1-6. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>.
- SANCHES, E. A., BOMBARDELLI, R. A., MARCOS, R. M., NEUMANN, G., DE TOLEDO, C. P. R., ROMAGOSA, E. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 153-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02598.x>.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., BAGGIO, D. M., TESSARO, L., BALEN, R. E., BOMBARDELLI, R. A. 2011a. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1163-1167. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., R. Y. OKAWARA, R.Y., CANEPPELE, R. D., BOMBARDELLI, A., ROMAGOSA, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. **Journal of Applied Ichthyology**, v.29, p.1114-1122. <https://doi.org/10.1111/jai.12165>.
- SANCHES, E. A., OKAWARA, R. Y., CANEPPELE, D., NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., ROMAGOSA, E. 2014. Storage of *Steindachneridion parahybae* oocytes at different temperatures. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.262-268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.022>.
- SANCHES, E. A., OKAWARA, R. Y., CANEPPELE, D., TOLEDO, C. P. R., BOMBARDELLI, R. A., ROMAGOSA, E. 2015. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112h of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v.31, p.79-88. <https://doi.org/10.1111/jai.12728>.
- STREIT JR, D.P., OLIVEIRA, A., RIBEIRO, R., SIROL, R., MORAES, G., GALO, J., DIGMAYER, M. 2018. Motilidade, vigor e patologias seminais in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**. 35.
- STREIT JR., D. P., DE OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO, R. P., SIROL, R. N., DE MORAES, GALO, G. V., DIGMAYER, J. M. 2009. Motility, vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 159-167.
- STREIT JR, D.P., MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., POVH, J. A., SOUZA, E. D., OLIVEIRA, C.A.L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 2, p. 157–162.

- TEODOZIA, E. R. P., ARAÚJO, M. S. O., LOPES, J. T., MONTENEGRO, A. R., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. 2020. Semen cryopreservation in *Piaractus mesopotamicus*: the effect of different diluents and freezing equipment. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, n. 2. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039>.
- VIVEIROS, A. T. M. 2005. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, v. 73, p. 1N-9N.
- VIVEIROS, A.T.M., GODINHO, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry** 35, 137–150.
- WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. 1987. Cold shock injury in animal cells. Symposium of the Society for Experimental Biology, v. 41, p. 311–340.
- WATSON, P. F. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 481-492, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).
- WEBER, A. A.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. 2012. Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae). **Zygote**, Cambridge, v.21, n.2, p.198-202. <https://doi.org/10.1017/S096719941200007X>.
- 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**, v.67, p.661-672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>.
- ZENG, Q., CHEN, Y., WANG, M., LI, Y., WEILING QIN, T.D., ZHU, Y., ZHANG, C., ZHOU, Y., QIN, Q., YANG, C., GU, Q. 2024. Study on sperm cryopreservation of hybrid fish derived from *Carassius cuvieri* (♀) × *Carassius auratus* red var (♂), *Reproduction and Breeding*, V 4, p 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.repbre.2024.09.002>.