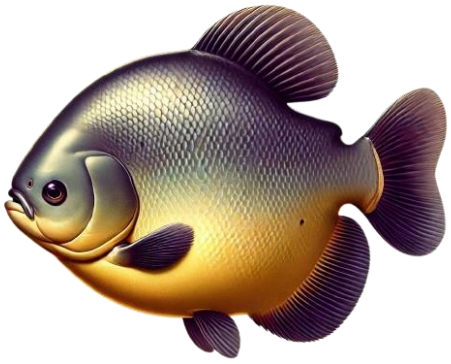
RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 19/12/2027.

The role of seminal plasma in fish sperm conservation: biochemical characterization, sperm motility relationships, and cryopreservation applications in *Piaractus mesopotamicus* and *Dicentrarchus labrax*





PhD Thesis - September, 2025

Author: Laís Pedroso Borges

Supervisors: Alexandre Ninhaus Silveira
Juan F. Asturiano

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

SÃO PAULO STATE UNIVERSITY– UNESP
INSTITUTE OF BIOSCIENCES – BOTUCATU
IN COTUTELLE WITH
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA – UPV
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA ANIMAL

The role of seminal plasma in fish sperm conservation: biochemical characterization, sperm motility relationships, and cryopreservation applications in *Piaractus mesopotamicus* and *Dicentrarchus labrax*

LAÍS PEDROSO BORGES

Thesis in co-tutelle submitted to the Institute of Biosciences of the São Paulo State University - UNESP, Postgraduate Program in Biological Sciences (Zoology), Câmpus de Botucatu, SP and to the Universitat Politècnica de València, Instituto de Ciencia y Tecnología Animal as part of the requirements to obtain the Ph.D. degree by both institutions.

Botucatu/Brazil
València/Spain
2025

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO – CRB 8/7500**

Borges, Laís Pedroso.

The role of seminal plasma in fish sperm conservation : biochemical characterization, sperm motility relationships and cryopreservation applications in *Piaractus mesopotamicus* and *Dicentrarchus labrax* / Laís Pedroso Borges. – Botucatu ; Valência, 2026.

100 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu. Universitat Politècnica de València, Instituto de Ciencia y Tecnología Animal.

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

Orientador: Juan Francisco Asturiano

1. Peixes. 2. Criopreservação. 3. Preservação do sêmen. 4. Plasma. 3. Motilidade dos espermatozoides. I. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: The role of seminal plasma in fish sperm conservation: biochemical characterization, sperm motility relationships, and cryopreservation applications in Piaractus mesopotamicus and Dicentrarchus labrax.

AUTORA: LAÍS PEDROSO BORGES

ORIENTADOR: ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRACOORIENTADORA: CRISTIANE BASHIYO DA SILVA

COORIENTADOR: JUAN FRANCISCO ASTURIANO NEMESIO

ORIENTADOR DE MOBILIDADE: JUAN FRANCISCO ASTURIANO NEMESIO (Internacional)

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

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

Profa. Dra. CARMINDA SANDRA BRITO SALMITO VANDERLEY (Participaçao Virtual)
Ciências Veterinárias / Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. LUIS DAVID SOLIS MURGAS (Participaçao Virtual)
Medicina Veterinária / Universidade Federal de Lavras - UFLA

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

Prof. Dr. JUAN FRANCISCO ASTURIANO NEMESIO (Participaçao Virtual)
Ciencia Animal / Universitat Politécnica de Valencia - UPV

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

Botucatu, 19 de dezembro de 2025.

unesp
Documento assinado digitalmente
Certificado ICPEdu
Dados: 2026.01.05 14:56:25 -03'00'

Willian Gabriel Miranda
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

The role of seminal plasma in fish sperm conservation: biochemical characterization, sperm motility relationships, and cryopreservation applications in *Piaractus mesopotamicus* and *Dicentrarchus labrax*

LAÍS PEDROSO BORGES

Thesis Supervisors

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

Prof. Dr. Juan F. Asturiano

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus avós, in memoriam, Milton Pedrozo e José Custódio Borges, que, embora não tenham podido me acompanhar nesta trajetória, deixaram suas sementes de amor e dedicação. Essas sementes germinaram no coração de minhas avós, Rosária Saran Pedroso e Conceição Aparecida Borges, e floresceram no exemplo e no carinho dos meus pais, Lucimar Pedroso Borges e Manoel Custódio Borges, a quem amo infinitamente e a quem devo tudo o que sou.

ACKNOWLEDGEMENTS

Agradecer é sempre um desafio, pois há o risco de esquecer pessoas que foram fundamentais nesta importante etapa da minha vida. Por isso, expresso minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para que tudo se tornasse possível.

Agradeço a **Deus** por me conceder o dom da vida e por tornar possível a realização de mais esta etapa acadêmica. Sua infinita benevolência me proporcionou saúde, sabedoria, paciência, fé e força para superar os momentos mais difíceis e solitários. **A Ele, toda honra e glória.**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira**, registro minha mais sincera e profunda gratidão por ter sido quem me iniciou na carreira científica e por estar ao meu lado durante quase dez anos de convivência no meio acadêmico. Sua paciência em cada correção, sua serenidade diante das dificuldades e, sobretudo, sua amizade e confiança foram pilares que sustentaram não apenas este trabalho, mas também minha formação como pessoa e profissional. Obrigada por sempre acreditar em mim, por me motivar a buscar o melhor de mim mesma e por guiar minha trajetória com dedicação e generosidade. Foi graças ao seu incentivo que conquistei o edital de intercâmbio, vivendo uma experiência transformadora que mudou minha vida. Levo comigo a certeza de que sua contribuição foi — e sempre será — fundamental em minha história.

A mi director en Valencia, el **Dr. Juan Francisco Asturiano Nemesio**, cariñosamente llamado Johnny, expreso mi más sincera gratitud por haberme recibido con los brazos abiertos e integrarme a su grupo de investigación con tanta generosidad. Su manera cercana de orientar, siempre disponible para responder con prontitud a mis dudas y ofrecer valiosas indicaciones, marcó una diferencia fundamental en el desarrollo de este trabajo. Además de un excelente investigador, guardo en usted el ejemplo de alguien que conduce la ciencia con dedicación, amabilidad y humanidad.

Aos meus pais, **Manoel e Lucimar,** minha mais profunda gratidão e todo o meu amor. Vocês foram meu alicerce nos momentos de desânimo e cansaço, enxugando minhas lágrimas e me consolando com palavras de esperança: "Vai dar tudo certo!". Com coragem e perseverança, romperam os limites de uma pequena cidade para me proporcionar a oportunidade de estudar em uma grande universidade. Fizeram sacrifícios inimagináveis, vendendo galinhas, queijos e

vacas para me sustentar nos momentos mais difíceis, enquanto suas orações me protegiam espiritualmente. Mesmo com o coração apertado, me permitiram voar para longe, para um país cuja língua e cultura eram desconhecidas, para que eu pudesse realizar o sonho do intercâmbio. O amor de vocês é minha maior inspiração. Amo vocês mais do que as palavras podem expressar!

Ao meu namorado e companheiro de vida, **Caio Padilha**, meu eterno agradecimento por todo amor, carinho, paciência e apoio incondicional. Você esteve ao meu lado nos momentos mais desafiadores desta jornada, tornando tudo mais leve com sua compreensão e perseverança. Mesmo diante da distância e das intermináveis chamadas, enfrentamos juntos cada obstáculo, fortalecendo ainda mais nosso vínculo. Te amo e sou profundamente grata por tudo que compartilhamos!

À minha irmã querida, **Gislane**, que, além de irmã, é amiga e mãe. Sempre esteve ao meu lado nos momentos de alegria e, principalmente, nos de dificuldade, quando eu pensava em desistir. Seu apoio foi inestimável.

Ao meu cunhado **Juliano,** que sempre me ajudou na revisão de resumos e textos, contribuindo para que eu pudesse melhorar minha escrita a cada dia.

Ao meu irmão **Samuel,** que mesmo à distância, compartilhou bons momentos comigo, junto à sua esposa, **Bruna**, e ao meu sobrinho **Arthur**, o lindo da titia, que amo imensamente.

Aos meus sogros, **Hero** e **Manoel Padilha**, minha profunda gratidão por todo o cuidado e apoio ao longo da minha jornada. Assim como meus pais, vocês sempre estiveram ao meu lado, ajudando-me a alcançar meus sonhos com carinho e dedicação. Obrigada por tudo!

Aos amigos **Jairo e Fre,** que me acolheram como pais em Ilha Solteira, cuidando de mim e me ajudando como se eu fosse da família.

À **Prof.ª Drª Rosicleire Veríssimo Silveira,** minha profunda gratidão por todo o suporte ao longo desses anos. Obrigada por cada ensinamento transmitido no laboratório, pelas conversas enriquecedoras e pela amizade que tornou essa jornada ainda mais especial.

Aos queridos amigos que fiz no **LINEO** (Laboratório de Ictiologia Neotropical), **Luciane, Lorena, Stella, Laicia, Malbelys, Maria Luiza, Patrícia, Bárbara, Yasmin, Mayara, Carmen, Bianca, Jordana, Letícia, Nataly, Denise e Lívia**, minha mais profunda gratidão. Vocês tornaram minha jornada de doutorado muito mais leve e especial. Juntos enfrentamos desafios, entramos em tanques, realizamos experimentos e, entre muitas risadas e momentos de trabalho ao lado dos peixes, construímos memórias que levarei para sempre. Obrigada pela persistência, pela força diante das dificuldades e pela disposição em ajudar. Vocês foram fundamentais nessa trajetória!

À **Prof.ª Drª Cristiéle da Silva Ribeiro**, minha gratidão por todo o auxílio nas análises dos componentes do plasma seminal, pela disposição em esclarecer dúvidas e pela amizade que construímos ao longo do tempo.

Aos **técnicos do Departamento de Biologia e Zootecnia, Sidival, Wilder e Elis**, por toda assistência nas soluções do laboratório e na manutenção dos equipamentos. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos **funcionários do Departamento de Biologia e Zootecnia**, minha sincera gratidão pela convivência, apoio e dedicação ao longo desta jornada. Em especial, agradeço à **Meire**, pela eficiência, disposição e cuidado em todos os momentos, e ao **Junior,** pelo auxílio constante e pela amizade genuína. Obrigada por cada conversa, gesto de apoio e pelo acolhimento que sempre fizeram toda a diferença nos momentos mais desafiadores. Aos cafés compartilhados e à generosidade de vocês, minha eterna gratidão!

À **Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu**, meu sincero agradecimento pela ajuda, eficiência e suporte durante o cumprimento das normas e regulamentos do programa. Em especial, à **Juliana,** minha profunda gratidão por todo o apoio no processo de cotutela e bolsa. Sua dedicação e prontidão fizeram toda a diferença, sendo um verdadeiro anjo em minha trajetória. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Antônio Leão Castilho**, coordenador da **Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia,** minha gratidão pelo auxílio no processo de cotutela. Sua dedicação e comprometimento são verdadeiramente inspir**a**dores.

Aos meus amigos do **Crossfit Black Wolf**, minha gratidão por tornarem essa jornada ainda mais leve e especial. Obrigada por cada desabafo, riso, choro compartilhado e, claro, pelas cervejinhas após os treinos. Vocês fizeram toda a diferença!

A los amigos del laboratorio en España, dejo registrada mi sincera gratitud por la compañía y por todos los recuerdos que llevaré conmigo. A la investigadora Luz, un agradecimiento especial por su cariño de siempre, por las charlas acompañadas de un café y por la paciencia al ayudarme con mis dudas del día a día. Fátima, tu dulzura y alegría iluminaron este camino y nuestra amistad fue un regalo; gracias también por todo tu apoyo y por las traducciones generosas. A mi querida amiga mexicana Wendy, compañera en los análisis y en la aplicación de hormonas en anguilas, estoy eternamente agradecida por cada momento compartido y por haber enriquecido mi vocabulario en español. A mi amigo Thales, compatriota brasileño que también vivió una estancia en Valencia, gracias por tu constante disposición a ayudar, siempre contribuyendo en las discusiones y en el desarrollo de la investigación. A Ana, mi gratitud por estar a mi lado en los últimos análisis del doctorado y por cada canción compartida, que trajo ligereza e inspiración a esta recta final. Y a mis queridas Marina, Leonor y Marta, gracias por las risas, por la ligereza en los días de trabajo y por los momentos de desconexión en las "cervezitas" y comidas, que hicieron que esta experiencia fuera aún más inolvidable.

Ao **Raul,** amigo que conheci no tranvia com sua icônica camiseta da USP, minha eterna gratidão. Foi nesse encontro inesperado que nasceu uma linda amizade, marcada por tantas histórias, risadas e momentos compartilhados. Vivemos juntos alegrias e desafios: moramos lado a lado, cuidamos um do outro quando adoecemos, fizemos bolo de cenoura, rimos das situações mais inusitadas (como quando você me defendeu da vizinha por causa do aspirador de pó ligado fora de hora) e saímos para "uma" cerveja, que nunca era só uma. Sua amizade foi um verdadeiro presente nesta jornada. Obrigada por tudo, Raul! Você foi e sempre será muito importante para mim.

À querida **Luciane**, carinhosamente conhecida como **"Lucicreidi",** minha eterna gratidão e carinho. Autêntica, destemida e cheia de alegria, você tornou os laboratórios do Brasil e da Espanha mais organizados, acolhedores e cheios de vida. Foi um privilégio conviver com você, compartilhar tantos momentos e saborear suas comidas deliciosas, que traziam o sabor de casa e aqueciam o coração. Sua amizade foi um presente inestimável nesta jornada, e o amor e

respeito que tenho por você são para a vida toda. Amo você, Luciane, e sou profundamente grata por tudo!

E à banca de qualificação, composta pelos professores **Dr. Eduardo Antônio Sanches** e **Dr. Sergio Ricardo Batlouni,** minha sincera gratidão por aceitarem participar deste momento tão significativo em minha trajetória acadêmica. Obrigada pela dedicação e contribuição valiosa!

A **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho**" e **Universitat Politècnica de València**, por todo o aparato.

Agradeço ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),** por meio do **Edital 26/21 e do Processo nº 200577/2022-0**, pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche.

Por fim, expresso minha sincera gratidão à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Programa de Excelência Acadêmica (PROEX),** por meio do **Processo nº 88887.660920/2022-00,** e à **Universidade Virtual de São Paulo (UNIVESP)** pela concessão da bolsa, bem como às demais bolsas que viabilizaram a realização desta pesquisa.

A todos, meu muito OBRIGADA!!

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT 11
RESUMEN 13
RESUMO 17
GENERAL INTRODUCTION 19
Advances and Challenges in Fish Sperm Cryopreservation 19
Emerging Approaches and the Role of Seminal Plasma 20
Species of Economic and Conservation Interest 21
Projects, grants and companies involved in this Thesis 23
OBJECTIVES 25
CHAPTER 1 26
Associations between the seminal plasma ionic composition and sperm kinetic parameters in *Piaractus mesopotamicus* 26
Abstract 27
Introduction 28
Material and methods 29
Specimen selection and management. 29
Seminal characteristic analysis. 30
Seminal plasma constituent analysis. 30
Statistical analyses. 31
Results 31
Spermatozoa kinetic parameters and seminal plasma composition in P. mesopotamicus. 31
Associations between different kinetic parameters and seminal plasma components. 33
Discussion 34
Conclusions 39
CHAPTER 2 40
Development of a sperm cryopreservation protocol for *Piaractus mesopotamicus* based on seminal plasma biochemical characteristics 40
Introduction 42
Materials and Methods 43
Gamete collection. 43
Evaluation of sperm characteristics 44
Sperm cryopreservation. 45

Membrane Integrity 46
Comet assay. 46
Fertilization. 47
Statistical analysis. 48
Results 49
Seminal characteristics of fresh sperm 49
Post-thaw sperm motility. 49
Discussion 56
Conclusion 58
CHAPTER 3 59
Seminal plasma as an extender in short-term storage and cryopreservation protocols for European sea bass sperm 59
Abstract 60
Introduction 61
Materials and methods 63
Ethics Statement. 63
Animal handling and sperm collection. 63
Seminal plasma collection. 64
Experiment 1. Short-term storage. 65
Experiment 2. Cryopreservation. 65
Evaluation of sperm kinetic parameters. 65
Sperm DNA fragmentation analysis. 66
Statistical analysis. 67
Results 68
Experiment 1 – Short-term storage. 68
Experiment 2 – Cryopreservation. 71
Discussion 74
Conclusion 77
GENERAL DISCUSSION 78
Future perspectives 79
CONCLUSIONS 81
REFERENCES 82

ABSTRACT

Sperm cryopreservation in fish is an important biotechnology for aquaculture and species conservation, enabling long-term gamete storage, off-season crossings, genetic material transport, and the preservation of genetic variability in both wild and farmed populations. Although many protocols have advanced, most remain limited to the freezing and thawing of spermatozoa, without considering the role of seminal plasma a fluid that naturally regulates motility, provides antioxidant protection, and maintains cellular integrity. Thus, understanding and exploiting the biochemical particularities of seminal plasma may be crucial to minimize the adverse effects of the cryogenic process and to enhance the effectiveness of conservation methods. The experiments described in Chapters 1 and 2 were conducted in Brazil using the neotropical freshwater species *Piaractus mesopotamicus* (pacu), widely farmed in continental aquaculture. Chapter 1 focused on the associations between the ionic composition of seminal plasma and sperm kinetic parameters. Multivariate analysis revealed correlations such as calcium with linear velocity (VSL) and glucose with total motility. These findings confirm the regulatory role of ions and organic components in preserving sperm functionality, demonstrating that seminal plasma functions not merely as a medium, but as an active modulator of semen quality. Chapter 2 addressed the development of a cryopreservation protocol for *P. mesopotamicus* based on prior knowledge of its semen. Different extender solutions were tested, formulated according to the ionic composition of seminal plasma. Among them, Treatment 3 stood out, combining higher velocity values with lower DNA fragmentation and higher fertilization rates after thawing. This highlights that tailoring extender solutions to the biochemical properties of seminal plasma is essential for minimizing cryodamage and optimizing post-thaw sperm viability. Chapter 3 was conducted in Spain (Valencia) with the commercially valuable marine species *Dicentrarchus labrax* (European sea bass). In this study, natural seminal plasma was compared with the synthetic extender NAM, a previously established medium. Results showed that seminal plasma was more effective in maintaining motility and sperm kinetic parameters during storage at 4 °C for up to 48 h and after cryopreservation, although no significant differences were observed in DNA fragmentation compared with NAM. This suggests that natural seminal plasma provides essential biochemical components, such as ions and antioxidants, absent in synthetic extenders, confirming it as a promising alternative for optimizing semen conservation protocols in marine species. Taken together, the three chapters emphasize that seminal plasma is not merely a supportive medium,

but an active element in regulating motility and preserving sperm integrity. Identifying its ionic and biochemical composition and applying it in cryopreservation protocols drive progress in aquaculture and genetic conservation, offering more efficient and sustainable alternatives for both freshwater and marine species.

RESUMEN

La criopreservación de esperma en peces es una biotecnología importante para la acuicultura y la conservación de especies, ya que permite el almacenamiento de gametos a largo plazo, los cruces fuera de temporada, el transporte de material genético y la preservación de la variabilidad genética en poblaciones silvestres y de cultivo. Aunque muchos protocolos han avanzado, la mayoría sigue limitada al congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides, sin considerar el papel del plasma seminal, un fluido que regula de forma natural la motilidad, proporciona protección antioxidante y mantiene la integridad celular. Por lo tanto, comprender y aprovechar las particularidades bioquímicas del plasma seminal puede ser fundamental para minimizar los efectos adversos del proceso criogénico y aumentar la eficacia de los métodos de conservación. Los experimentos descritos en los Capítulos 1 y 2 se realizaron en Brasil utilizando la especie neotropical de agua dulce *Piaractus mesopotamicus* (pacu), ampliamente cultivada en la acuicultura continental. El Capítulo 1 se centró en las asociaciones entre la composición iónica del plasma seminal y los parámetros cinéticos espermáticos. El análisis multivariado reveló correlaciones, como calcio con velocidad lineal (VSL) y glucosa con motilidad total. Estos hallazgos confirman el papel regulador de los iones y los compuestos orgánicos en la preservación de la funcionalidad espermática, demostrando que el plasma seminal no actúa solo como un medio, sino como un modulador activo de la calidad del semen. El Capítulo 2 abordó el desarrollo de un protocolo de criopreservación para *P. mesopotamicus* a partir del conocimiento previo de su semen. Se probaron diferentes soluciones extensoras formuladas de acuerdo con la composición iónica del plasma seminal. Entre ellas, el Tratamiento 3 se destacó por combinar valores más altos de velocidad con menores índices de fragmentación de ADN y mayores tasas de fertilización tras la descongelación. Esto resalta que la personalización de las soluciones extensoras según las propiedades bioquímicas del plasma seminal es esencial para minimizar el daño criogénico y optimizar la viabilidad espermática post-descongelación. El Capítulo 3 se llevó a cabo en España (Valencia) con la especie marina de alto valor comercial *Dicentrarchus labrax* (lubina europea). En este estudio, se comparó el plasma seminal natural con el diluyente sintético NAM, previamente establecido. Los resultados mostraron que el plasma seminal fue más eficaz en el mantenimiento de la motilidad y de los parámetros cinéticos durante el almacenamiento a 4 °C hasta 48 h y después de la criopreservación, aunque no se observaron diferencias significativas en la fragmentación de ADN en comparación con NAM. Esto sugiere que el plasma seminal natural aporta

componentes bioquímicos esenciales, como iones y antioxidantes, ausentes en los diluyentes sintéticos, lo que lo confirma como una alternativa prometedora para optimizar los protocolos de conservación de semen en especies marinas. En conjunto, los tres capítulos enfatizan que el plasma seminal no es solo un medio de soporte, sino un elemento activo en la regulación de la motilidad y en la preservación de la integridad de los espermatozoides. La identificación de su composición iónica y bioquímica, junto con su aplicación en protocolos de criopreservación, impulsa el progreso en la acuicultura y en la conservación genética, ofreciendo alternativas más eficientes y sostenibles tanto para especies de agua dulce como marinas.

RESUM

La criopreservació d'esperma en peixos és una biotecnologia important per a l'aqüicultura i la conservació d'espècies, ja que permet l'emmagatzematge de gàmetes a llarg termini, els creuaments fora de temporada, el transport de material genètic i la preservació de la variabilitat genètica en poblacions silvestres i de cultiu. Encara que molts protocols han avançat, la majoria continua limitada a la congelació i descongelació dels espermatozoides, sense tindre en compte el paper del plasma seminal, un fluid que regula de manera natural la motilitat, proporciona protecció antioxidant i manté la integritat cel·lular. Per tant, comprendre i aprofitar les particularitats bioquímiques del plasma seminal pot ser fonamental per a minimitzar els efectes adversos del procés criogènic i augmentar l'eficàcia dels mètodes de conservació. Els experiments descrits als Capítols 1 i 2 es van realitzar al Brasil utilitzant l'espècie neotropical d'aigua dolça *Piaractus mesopotamicus* (pacu), àmpliament cultivada en l'aqüicultura continental. El Capítol 1 es va centrar en les associacions entre la composició iònica del plasma seminal i els paràmetres cinètics espermàtics. L'anàlisi multivariant va revelar correlacions, com ara el calci amb la velocitat lineal (VSL) i la glucosa amb la motilitat total. Estes troballes confirmen el paper regulador dels ions i els compostos orgànics en la preservació de la funcionalitat espermàtica, demostrant que el plasma seminal no actua només com un medi, sinó com un modulador actiu de la qualitat del semen. El Capítol 2 va abordar el desenvolupament d'un protocol de criopreservació per a *P. mesopotamicus* a partir del coneixement previ del seu semen. Es van provar diferents solucions extensoress formulades d'acord amb la composició iònica del plasma seminal. Entre elles, el Tractament 3 es va destacar per combinar valors més alts de velocitat amb menors índexs de fragmentació d'ADN i majors taxes de fecundació després de la descongelació. Açò ressalta que la personalització de les solucions extensoress segons les propietats bioquímiques del plasma seminal és essencial per a minimitzar el dany criogènic i optimitzar la viabilitat espermàtica post-descongelació. El Capítol 3 es va dur a terme a Espanya (València) amb l'espècie marina de gran valor comercial *Dicentrarchus labrax* (llobarro europeu). En este estudi, es va comparar el plasma seminal natural amb el diluent sintètic NAM, prèviament establit. Els resultats van mostrar que el plasma seminal va ser més eficaç en el manteniment de la motilitat i dels paràmetres cinètics durant l'emmagatzematge a 4 °C fins a 48 h i després de la criopreservació, encara que no es van observar diferències significatives en la fragmentació d'ADN en comparació amb NAM. Açò suggereix que el

plasma seminal natural aporta components bioquímics essencials, com ara ions i antioxidants, absents en els diluents sintètics, i el confirma com una alternativa prometedora per a optimitzar els protocols de conservació de semen en espècies marines. En conjunt, els tres capítols destaquen que el plasma seminal no és només un medi de suport, sinó un element actiu en la regulació de la motilitat i en la preservació de la integritat dels espermatozoides. La identificació de la seua composició iònica i bioquímica, junt amb la seua aplicació en protocols de criopreservació, impulsa el progrés en l'aqüicultura i en la conservació genètica, oferint alternatives més eficients i sostenibles tant per a espècies d'aigua dolça com marines.

RESUMO

A criopreservação de sêmen em peixes é uma biotecnologia importante para a aquicultura e a preservação de espécies, possibilitando o armazenamento de gametas por longos períodos, permitindo cruzamentos fora de época, o transporte de material genético e a preservação da variabilidade genética em populações selvagens e em cultivo. Embora muitos protocolos tenham avançado, a maior parte deles se limita ao congelamento e descongelamento dos espermatozoides, sem levar em conta o papel do plasma seminal, o fluido que, de forma natural, regula a motilidade, oferece proteção antioxidante e mantém a integridade celular. Com isso, conhecer e explorar as particularidades bioquímicas do plasma seminal pode ser fundamental para minimizar os efeitos adversos do processo criogênico e aumentar a eficácia dos métodos de conservação. Os experimentos dos Capítulos 1 e 2 foram realizados no Brasil, utilizando a espécie neotropical de água doce *Piaractus mesopotamicus* (pacu), amplamente cultivada na aquicultura continental. No primeiro capítulo, foram descritas as associações entre a composição iônica do plasma seminal de *P. mesopotamicus* e os parâmetros cinéticos espermáticos. A análise multivariada indicou algumas correlações, como cálcio e velocidade linear (VSL) e a glicose sobre a motilidade total. Esses resultados confirmam o papel regulador dos íons e de componentes orgânicos na preservação da funcionalidade espermática, demonstrando que o plasma seminal não atua apenas como meio, mas como modulador ativo da qualidade do sêmen. O segundo capítulo, se dedicou ao desenvolvimento de um protocolo de criopreservação para a espécie *P. mesopotamicus*, aplicando as informações previamente obtidas sobre o sêmen. Foram testadas diferentes soluções extensoras baseadas nas concentrações iônicas do plasma seminal. Entre eles, o Tratamento 3 destacou-se por associar maiores valores de velocidade a menores índices de fragmentação de DNA e maiores taxas de fertilização após o descongelamento, evidenciando que a personalização das soluções extensoras conforme as características bioquímicas do plasma seminal são importantes para minimizar danos e otimizar a viabilidade espermática pós-descongelamento. O Capítulo 3 foi desenvolvido na Espanha (Valência), com a espécie marinha de elevado valor comercial *Dicentrarchus labrax* (robalo-europeu). Nesse estudo, comparou-se o plasma seminal natural com o diluidor sintético NAM, previamente estabelecido. Os resultados demonstraram que o plasma seminal foi mais eficiente na manutenção da motilidade e dos parâmetros cinéticos durante o armazenamento a 4 °C por até 48 h e após a criopreservação, ainda que não tenham sido observadas diferenças significativas na fragmentação de DNA em relação ao NAM. Isso

sugere que o plasma seminal natural oferece componentes bioquímicos essenciais, como íons e antioxidantes, que não estão presentes em diluentes sintéticos, confirmando-o como uma alternativa promissora para otimizar protocolos de conservação de sêmen em espécies marinhas. Em conjunto, os três capítulos destacam que o plasma seminal não é apenas um meio de sustentação, mas sim um elemento ativo na regulação da motilidade e na preservação da integridade dos espermatozoides. A identificação de sua composição iônica e bioquímica, juntamente com sua utilização em protocolos de criopreservação, impulsiona o progresso na aquicultura e na conservação genética, proporcionando alternativas mais eficientes e sustentáveis para espécies de água doce e marinhas.

GENERAL INTRODUCTION

Advances and Challenges in Fish Sperm Cryopreservation

Among the various biotechnologies that support assisted reproduction, fish sperm cryopreservation stands out as one of the most significant, influencing aquaculture, biodiversity conservation, and the genetic management of both wild and farmed populations. This technique enables the long-term preservation of genetic material, addresses problems of asynchrony between males and females, ensures the safe transport of gametes across different production units, and allows the establishment of germplasm banks, which are essential for preserving genetic diversity and may aid in the recovery of natural populations (Viveiros & Godinho, 2009; Cabrita et al., 2010; Magnotti et al., 2018; Di Iorio et al., 2023).

The first attempts at fish sperm cryopreservation took place in the 1950 and 1960, in *Clupea harengus*, based on adaptations of methods originally developed for mammals (Blaxter, 1953). Since then, significant advances have been made in slow-freezing protocols for fish, while ultra-rapid vitrification techniques have been developed for oocytes and embryos (Suquet et al., 2000; Asturiano et al., 2017; Magnotti et al., 2018). The development of suitable extenders and cryoprotectants has also been critical to the success of this technique in fish, given the physiological differences between fish and mammalian spermatozoa (Lahnsteiner et al., 2000; Cabrita et al., 2010). In recent decades, substances such as dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, and glucose have become the most commonly used cryoprotectants, often combined with saline or sugar-based extenders to maintain osmotic stability and minimize cryodamage (Muchlisin et al., 2004; Maria et al., 2006).

Despite being a common practice, fish sperm cryopreservation still faces many challenges. One of the most critical relates to the damage caused to cells during freezing and thawing. Ice crystal formation, both intra- and extracellular, can rupture plasma membranes, disorganize cytoplasmic structures, and damage mitochondria, thereby impairing sperm motility and viability (Yang et al., 2016; Figueroa et al., 2017). Moreover, biochemical alterations induced by cryogenic stress can lead to DNA fragmentation and the production of reactive oxygen species (ROS), which exacerbate oxidative stress (Sandoval-Vargas et al., 2020; Alevra et al., 2022). Although the inclusion of antioxidants, proteins, and protective compounds in cryogenic media has shown positive effects in mitigating such damage, standardized protocols remain scarce, particularly for tropical and neotropical species that display wide physiological diversity (Garcia et al., 2016; Lassen et al., 2021).

REFERENCES

Alavi, S. M. H., & Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, *30*(1), 1–14. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004

Alavi, S. M. H., Cosson, J., Bondarenko, O., & Linhart, O. (2019). Sperm motility in fishes: (III) Diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme. *Theriogenology*, *136*, 143–165. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.038

Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H., & Mojazi Amiri, B. (2004). Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. *Aquaculture Research*, *35*(13), 1238–1243. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01132.x

Alavi, S. M. H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., & Linhart, O. (2007). Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, *68*(2), 276–283. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.045

Alevra, A., Exadactylos, A., Mente, E., & Papadopoulos, S. (2022). The protective role of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals and human: Lessons for male fish cryopreservation. *Animals*, *12*(6), 791. https://doi.org/10.3390/ani12060791

Allegrucci, G., Fortunato, C., & Sbordoni, V. (1997). Genetic structure and allozyme variation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* and *D. punctatus*) in the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, *128*(3), 347–358. https://doi.org/10.1007/s002270050100

Almeida, R., Tanner, S., Mateus, C., Ribeiro, F., & Quintella, B. (2023). Not so much a sea bass: Divergent European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) freshwater incursions. *Journal of Fish Biology*, *103*(5), 1075–1088. https://doi.org/10.1111/jfb.15641

Andrade, E. S., Paula, D. A. J., Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S., & Veras, G. C. (2014). Milt cryopreservation for rheophilic fish threatened by extinction in the Rio Grande, Brazil. *CryoLetters*, *35*(1), 8–14.

Aramli, M. S., Kalbassi, M. R., & Nazari, R. M. (2014). Selected biochemical parameters in plasma of blood and semen of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Comparative Clinical Pathology*, *23*(5), 1241–1245. https://doi.org/10.1007/s00580-013-1769-6

Aramli, M. S., Sarvi Moghanlou, K., & Pourahad Anzabi, M. (2024). A brief review of the methodology and cryoprotectants in selected fish and mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, *59*(5), e14575. https://doi.org/10.1111/rda.14575

Asturiano, J. F., Cabrita, E., & Horváth, Á. (2017). Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, *245*, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019

Asturiano, J. F., Pérez, L., Garzón, D. L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D. S., Vicente, J. S., & Jover, M. (2004). Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry, 30*(3), 283–293. https://doi.org/10.1007/s10695-005-1553-x

Asturiano, J. F., Pérez, L., Garzón, D. L., Peñaranda, D. S., Marco-Jiménez, F., Martínez-Llorens, S., Tomás, A., & Jover, M. (2005). Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquaculture Research, 36*(15), 1480–1487. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01366.x

Atroshchenko, M. M., Shitikova, A. M., Nezalenova, A. A., Frolova, N. A., Shirokova, O. V., & Marsyanova, Y. A. (2024). Lipid profile of stallion seminal plasma and its influence on semen quality and cryoresistance. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 149, p. 01001). EDP Sciences. https://doi.org/10.1051/bioconf/202414901001

Badr, M. R., Rawash, Z. M., Hassan, H. M., Elaraby, M. E., Amer, M., & Ahmed, K. M. (2021). Effect of extenders, cryoprotectants, and freezing methods on sperm quality and fertilization rate of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 25*(2), 63–74. https://doi.org/10.21608/EJABF.2021.158328

Beirão, J., Boulais, M., Gallego, V., O'Brien, J. K., Peixoto, S., Robeck, T. R., & Cabrita, E. (2019). Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology, 133*, 161–178. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.004

Beltrán, J., Zamorano, M., Belén, L., Risopatrón, J., Valdebenito, I., Norambuena, J., Farías, J., & Farías, J. A. (2021). A differential proteomic study reveals the downregulation of several plasma membrane Ca^{2+}-binding proteins in the sperm of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following cold storage. *Aquaculture, 545*, 737211. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737211

Blaxter, J. H. S. (1953). Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature, 172*(4388), 1190. https://doi.org/10.1038/1721190a0

Bobe, J., & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology, 165*(3), 535–548. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011

Bozkurt, Y., Öğretmen, F., Ercin, U., & Yıldız, Ü. (2008). Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) semen: With emphasis on sperm motility. *Aquaculture Research, 39*(15), 1666–1672. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02041.x

Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Secer, F. S., & Ercin, U. (2009). Efeitos da composição do plasma seminal na motilidade espermática em carpa-espelho (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 61*(4), 307–314. https://doi.org/10.46989/001c.20570

Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Kokcu, O., & Ercin, U. (2011). Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril,

1858) semen: With emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science*, *56*(8), 368–378. https://doi.org/10.17221/2394-CJAS

Browne, R., Kaurova, S., Uteshev, V., Shishova, N., McGinnity, D., Figiel, C., Mansour, N., Agnew, D., Wu, M., Gakhova, E., Dzyuba, B., & Cosson, J. (2015). Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*, *83*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.018

Bubeníčková, F., Postlerová, P., Šimoník, O., Sirohi, J., & Šichtař, J. (2020). Effect of seminal plasma protein fractions on stallion sperm cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6415. https://doi.org/10.3390/ijms21176415

Cabral, H., & Costa, M. (2001). Abundance, feeding ecology and growth of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, within the nursery areas of the Tagus estuary. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *81*(4), 679–682. https://doi.org/10.1017/S0025315401004362

Cabrita, E., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C., & Dinis, M. (2011). The influence of certain amino acids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science*, *125*(1–4), 189–195. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.003

Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, C., Herráez, M. P., & Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, *432*, 389–401. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herráez, M. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, *26*(5), 623–635. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x

Carneiro-Leite, L., Bashiyo-Silva, C., Oliveira, Y. A. A., Borges, L. P., Padilla Sanchez, M., Gomes da Silva, L., Lobato, S. I. R., Rodrigues-Lisoni, F. C., Veríssimo-Silveira, R., & Ninhaus-Silveira, A. (2020). Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethyl sulfoxide and methyl glycol. *Neotropical Ichthyology*, *18*(3), e20200039. https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0039

Carolsfeld, J., Godinho, H., Filho, E., & Harvey, B. (2003). Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, *63*(2), 472–489. https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x

Castro, J. S., Braz-Mota, S., Campos, D. F., Souza, S. S., & Val, A. L. (2020). High temperature, pH, and hypoxia cause oxidative stress and impair the spermatic performance of the Amazon fish *Colossoma macropomum*. *Frontiers in Physiology*, *11*, 772. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00772

Cejko, B., Żarski, D., Sarosiek, B., Dryl, K., Palińska-Żarska, K., Skorupa, W., & Kowalski, R. (2022). Application of artificial seminal plasma to short-term storage of a large volume of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm for two weeks under controlled conditions. *Aquaculture, 546*, 737385. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737385

Chao, N., & Liao, I. (2001). Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture, 197*(1–4), 161–189. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00586-5

Chen, Y., Men, Y., Yan, K., Ali, W., Li, Z., Cai, W., He, Y., & Qi, J. (2025). Regulatory role of exosomal proteins MIF and PEBP1 in sperm storage in black rockfish (*Sebastes schlegelii*) ovary. *Aquaculture*, *598*, 741985. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741985

Ciereszko, A., & Dabrowski, K. (1995). Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: An across-season study. *Biology of Reproduction, 52*(5), 982–988. https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.982

Ciereszko, A., Dietrich, G. J., Nynca, J., Dobosz, S., & Krom, J. (2015). Maturation of spermatozoa from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sex-reversed females using artificial seminal plasma or glucose–methanol extender. *Theriogenology, 83*(7), 1213–1218. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.028

Ciereszko, A., Dietrich, M., & Nynca, J. (2017). Fish semen proteomics—New opportunities in fish reproductive research. *Aquaculture, 472*, 81–92. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.005

Ciereszko, A., Glogowski, J., & Dabrowski, K. (2000). Fertilization in landlocked sea lamprey: Storage of gametes, optimal sperm:egg ratio, and methods of assessing fertilization success. *Journal of Fish Biology, 56*(3), 495–505. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00750.x

Coscia, I., & Mariani, S. (2011). Phylogeography and population structure of European sea bass in the north-east Atlantic. *Biological Journal of the Linnean Society, 104*(2), 364–377. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01712.x

Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International, 12*(1), 69–85. https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc

Cosson, J., Groison, A. L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., & Billard, R. (2008). Studying sperm motility in marine fish: An overview on the state of the art. *Journal of Applied Ichthyology, 24*(4), 460–486. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01151.x

Costa, R. M. R. D., & Mateus, L. A. D. F. (2009). Reproductive biology of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei: Characidae) in the Cuiabá River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology, 7*(3), 447–458. https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000300012

Da Fonseca Ferreira, A., Lehmann, A., Grard, T., Roquigny, R., & Bris, L. (2025). Genetic diversity and virulence gene profiling of *Vibrio harveyi* in a vibriosis-affected European seabass

(*Dicentrarchus labrax*) aquaculture tank. *Marine Pollution Bulletin, 212*, 117553. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.117553

De Jesus Paula, D., Melo, N., Carneiro, W., De Castro Uzeda, P., Chaves, B., Konig, I., & Murgas, L. (2022). Cryopreservation of semen in streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*): Use of ultra-freezer as alternative technique to liquid nitrogen. *Aquaculture International, 30*(8), 2629–2639. https://doi.org/10.1007/s10499-022-00926-3

Del Pazo, F., Sánchez, S., Posner, V. M., Sciara, A. A., Arranz, S. E., & Villanova, G. V. (2021). Genetic diversity and structure of the commercially important native fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*) from cultured and wild fish populations: Relevance for broodstock management. *Aquaculture International, 29*(1), 289–305. https://doi.org/10.1007/s10499-020-00626-w

Dietrich, M., Irnazarow, I., & Ciereszko, A. (2017). Proteomic identification of seminal plasma proteins related to the freezability of carp semen. *Journal of Proteomics, 162*, 52–61. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.015

Di Iorio, M., Esposito, S., Rusco, G., Roncarati, A., Miranda, M., Gibertoni, P., Cerolini, S., & Iaffaldano, N. (2019). Semen cryopreservation for the Mediterranean brown trout of the Biferno River (Molise, Italy): Comparative study on the effects of basic extenders and cryoprotectants. *Scientific Reports, 9*, 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45006-4

Di Iorio, M., Rusco, G., Esposito, S., D'Andrea, M., Roncarati, A., & Iaffaldano, N. (2023). The role of semen cryobanks for protecting endangered native salmonids: Advantages and perspectives as outlined by the LIFE Nat.Sal.Mo. project on Mediterranean brown trout (Molise region – Italy). *Frontiers in Marine Science, 9*, 1075498. https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1075498

Diwan, A. D., Harke, S. N., Gopalkrishna, & Panche, A. N. (2020). Cryobanking of fish and shellfish egg, embryos and larvae: An overview. *Frontiers in Marine Science, 7*, 251. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00251

Engel, K. M., Dzyuba, V., Ninhaus-Silveira, A., Veríssimo-Silveira, R., Dannenberger, D., Schiller, J., Steinbach, C., & Dzyuba, B. (2020). Sperm lipid composition in early diverged fish species: Internal vs. external mode of fertilization. *Biomolecules, 10*(2), 172. https://doi.org/10.3390/biom10020172

FAO. (2022). *The state of world fisheries and aquaculture 2022: Towards blue transformation.* FAO. https://doi.org/10.4060/cc0461en

FAO. (2024). *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758. In *Pesca e Aquicultura.* Accessed December 14, 2024. https://www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2291/en

Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V., & Menu, B. (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquatic Living Resources, 11*(6), 387–394. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80004-7

Fauvel, C., Boryshpolets, S., Cosson, J., Leedy, J. G. W., Labbé, C., Haffray, P., & Suquet, M. (2012). Improvement of chilled seabass sperm conservation using a cell culture medium. *Journal of Applied Ichthyology*, *28*(6), 961–966. https://doi.org/10.1111/jai.12071

Félix, F., Gallego, V., Mendes, A., Soares, F., Vera, L. M., Cabrita, E., & Oliveira, C. C. (2023). Novel approaches on melatonin role: Presence of clock-hormone in fish seminal plasma. *Aquaculture*, *573*, 739578. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739578

Figueroa, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Isachenko, V., & Valdebenito, I. (2013). Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture*, *372*, 119–126. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.019

Figueroa, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., Isachenko, E., Farías, J., & Valdebenito, I. (2015). Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, *83*(2), 238–245.e2. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.015

Figueroa, E., Valdebenito, I., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Dumorné, K., Castillo, R. L., & Farías, J. G. (2017). Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquaculture*, *9*(1), 76–87. https://doi.org/10.1111/raq.12105

Figueroa, E., Lee-Estevez, M., Valdebenito, I., Watanabe, I.-S., Oliveira, R. P. de S., Romero, J., Castillo, R. L., & Farías, J. G. (2019). Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. *Aquaculture*, *511*, 634190. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.004

Fonseca, F., Fuentes, J., Vizcaíno, A. J., Alarcón, F. J., Mancera, J. M., Martínez-Rodríguez, G., & Martos-Sitcha, J. A. (2023). From invasion to fish fodder: Inclusion of the brown algae *Rugulopteryx okamurae* in aquafeeds for European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L., 1758). *Aquaculture*, *568*, 739318. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739318

França, T., González-López, W., Sanchez, M., Ferrão, L., Fernández-García, F., Borges, L., Belenguer, Á., Holhorea, P., Calduch-Giner, J., Felip, A., Gómez, A., Pérez-Sánchez, J., Streit, D., & Asturiano, J. F. (2023). Successful cryopreservation in biodegradable containers of sperm from aquaculture Mediterranean fishes. *Theriogenology*, *216*, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.016

Freitas, M., Lira, L., Ariede, R., Agudelo, J., de Oliveira Neto, R., Borges, C., Mastrochirico-Filho, V., Neto, B., Carvalheiro, R., & Hashimoto, D. (2021). Genotype by environment interaction and genetic parameters for growth traits in the Neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, *534*, 735933. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735933

Gaitskell-Phillips, G., Martín-Cano, F., Ortiz-Rodríguez, J., Da Silva-Álvarez, E., Massot, J., Redondo, E., Gil, M., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. (2021). Seminal plasma proteins as potential biomarkers for sperm motility and velocities. *Theriogenology*, *177*, 34–41. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.007

Galetti, M., Donatti, C., Pizo, M., & Giacomini, H. (2008). Big fish are the best: Seed dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. *Biotropica*, *40*(4), 386–389. https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00378.x

Gallego, V., Pérez, L., Asturiano, J. F., & Yoshida, M. (2013). Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture*, *416*, 238–243. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.035

Gallego, V., Cavalcante, S. S., Fujimoto, R. Y., Carneiro, P. C. F., Azevedo, H. C., & Maria, A. N. (2017). Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*, *87*, 16–24. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.001

Gallego, V., & Asturiano, J. F. (2018). Sperm motility in fish: Technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(6), 820–832. https://doi.org/10.1071/RD17460

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 Physiology and Biochemistry*, *44*(6), 1457–1467. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0505-1

Garcia, R. R., Streit Jr., D. P., Cabrita, E., & Godoy, L. C. (2016). Semen cryopreservation in Brazilian freshwater fish: Advances and main challenges. In *Cryopreservation in eukaryotes*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/65037

Gazo, I., Dietrich, M., Prulière, G., Shaliutina-Kolešová, A., Shaliutina, O., Cosson, J., & Chenevert, J. (2017). Protein phosphorylation in spermatozoa motility of *Acipenser ruthenus* and *Cyprinus carpio*. *Reproduction*, *154*(6), 653–673. https://doi.org/10.1530/REP-16-0662

Gheller, S., Corcini, C., De Brito, C., Acosta, I., Tavares, G., Soares, S., Silva, A., Pires, D., & Varela, A. (2019). Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiarius marmoratus*. *Cryobiology*, *87*, 74–77. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.001

Gilroy, C. E., & Litvak, M. K. (2019). Swimming kinematics and temperature effects on spermatozoa from wild and captive shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Animal Reproduction Science*, *204*, 171–182. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.022

Hatef, A., Niksirat, H., Amiri, B., Alavi, S., & Karami, M. (2007). Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture Research*, *38*(11), 1175–1181. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01784.x

Herrera, F., Bondarenko, O., & Boryshpolets, S. (2021). Osmoregulation in fish sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, *47*(3), 785–795. https://doi.org/10.1007/s10695-021-00958-1

Iervolino, F., Resende, E., & Hilsdorf, A. (2010). The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research, 101*(1–2), 27–31. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.09.003

Ingermann, R., Bencic, D., & Gloud, J. (2001). Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm motility in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, *24*(4), 299–307. https://doi.org/10.1023/A:1015037422720

Judycka, S., Nynca, J., Liszewska, E., Dobosz, S., Grudniewska, J., & Ciereszko, A. (2018). Optimal sperm concentration in straws and final glucose concentration in extender are crucial for improving the cryopreservation protocol of salmonid spermatozoa. *Aquaculture, 486*, 90–97. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.019

Judycka, S., Żarski, D., Dietrich, M., Karol, H., Hliwa, P., Błażejewski, M., & Ciereszko, A. (2021). Toward commercialization: Improvement of a semen cryopreservation protocol for European perch enables its implementation for commercial-scale fertilization. *Aquaculture, 545*, 737790. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737790

Judycka, S., Nynca, J., Hliwa, P., & Ciereszko, A. (2021). Characteristics and cryopreservation of semen of sex-reversed females of salmonid fish. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 964. https://doi.org/10.3390/ijms22020964

Judycka, S., Dietrich, M., Nynca, J., & Ciereszko, A. (2024). Preservation of fish male germplasm in Poland. *Frontiers in Marine Science, 11*, 1407895. https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1407895

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., & Ahnström, G. (1996). The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *DNA Repair, 363*(2), 89–96. https://doi.org/10.1016/0921-8777(95)00063-1

Kowalski, R. K., & Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, *135*, 94–108. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009

Kuradomi, R. Y., De Souza, T. G., Foresti, F., Schulz, 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*, *225*, 162–173. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.06.007

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., & Patzner, R. A. (1996). Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry, 15*(2), 167–179. https://doi.org/10.1007/BF01875596

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horváth, Á., Urbányi, B., & Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology, 54*(9), 1477–1498. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00469-6

Lahnsteiner, F., Mansour, N., & Berger, B. (2004). Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology, 62*(5), 801–808. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.001

Lahnsteiner, F., Mansour, N., McNiven, M., & Richardson, G. (2009). Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. *Aquaculture, 298*(1–2), 118–124. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.034

Lahnsteiner, F., & Mansour, N. (2010). A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture, 307*(1–2), 130–140. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.011

Lassen, P., Canozzi, M., Costa, B., Barcellos, J., & Streit, D. (2021). Cryopreserved semen motility of South American Neotropical fish: A meta-analysis. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 30*(1), 19–32. https://doi.org/10.1080/23308249.2021.1884643

Leite, R., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C., Milan, M., Bargelloni, L., & Cabrita, E. (2012). Can post-thaw sperm quality affect progeny from European seabass? *Cryobiology, 65*(3), 343. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.07.016

Li, P., Du, H., Qiao, X., Liu, Z., Zhou, Q., & Wei, Q. (2019). Protein profile of Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) spermatozoa and relationship to sperm quality. *Animal Reproduction Science, 201*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.002

Liu, Q., Zhu, C., Wang, Y., Zheng, L., Jin, T., He, S., Yang, F., & Dong, W. (2023). Metformin improves fish sperm quality by regulating glucose uptake capacity during in vitro storage. *Journal of Animal Science, 101*(7), skad152. https://doi.org/10.1093/jas/skad152

Magnotti, C., Cerqueira, V., Lee-Estevez, M., Farías, J., Valdebenito, I., & Figueroa, E. (2018). Cryopreservation and vitrification of fish semen: A review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture, 10*(1), 15–25. https://doi.org/10.1111/raq.12145

Mansour, N., Ramoun, A., & Lahnsteiner, F. (2005). Quality of testicular semen of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with fertilization and hatching success. *Aquaculture Research, 36*(15), 1422–1428. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01363.x

Maria, A., Viveiros, A., Freitas, R., & Oliveira, A. (2006). Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture, 260*(1–4), 298–306. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.011

Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M., Herráez, M. P., Sarasquete, C., & Cabrita, E. (2012). Incorporation of ascorbic acid and α-tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology, 77*(6), 1129–1136. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017

Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M. T., Soares, F., Sarasquete, C., & Cabrita, E. (2013). Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine, in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, *66*(3), 333–338. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.001

Mascali, F., Posner, V., Marano, E., Del Pazo, F., Hermida, M., Sánchez, S., Mazzoni, T., Martínez, P., Rubiolo, J., & Villanova, G. (2022). Development and validation of sex-specific markers in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, *560*, 738374. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738374

Mastrochirico-Filho, V., Ariede, R., Freitas, M., Borges, C., Lira, L., Mendes, N., Agudelo, J., Cáceres, P., Berrocal, M., Sucerquia, G., Porto-Foresti, F., Yáñez, J., & Hashimoto, D. (2021). Development of a multi-species SNP array for serrasalmid fish *Colossoma macropomum* and *Piaractus mesopotamicus*. *Scientific Reports*, *11*, 98885. https://doi.org/10.1038/s41598-021-98885-9

Mastrochirico-Filho, V., Garcia, B., Da Silva Manso, S., Freitas, M., Porto-Foresti, F., Cáceres, P., Yáñez, J., & Hashimoto, D. (2024). Assessing accuracy of imputation using different SNP densities as a strategy for breeding programs of the fish pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture Reports*, *32*, 102140. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102140

Mateus, L., Rodrigues Costa, R. M., & Penha, J. (2022). Spatiotemporal diet shifting in a neotropical fish species: The role of riparian vegetation and seasonal inundation. *Frontiers in Environmental Science*, *10*, 883298. https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.883298

Medina-Robles, V. M., Guaje-Ramírez, D. N., Marin-Cossio, L. C., Sandoval-Vargas, L. Y., & Cruz-Casallas, P. E. (2019). Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. *Orinoquia*, *23*(1), 15–24. https://doi.org/10.22579/20112629.537

Medina-Robles, V. M., Duarte-Trujillo, A. S., & Cruz-Casallas, P. E. (2020). Crioconservación seminal en peces de agua dulce: Aspectos biotecnológicos, celulares y bioquímicos. *Orinoquia*, *24*(2), 51–78. https://doi.org/10.22579/20112629.621

Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., & Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Animal Reproduction Science*, *124*(1–2), 125–131. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.023

Merino, O., Sánchez, R., Risopatrón, J., Isachenko, E., Katkov, I., Figueroa, E., Valdebenito, I., Mallmann, P., & Isachenko, V. (2012). Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: First report. *Andrologia*, *44*(5), 390–395. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01196.x

Montero, D., Carvalho, M., Terova, G., Fontanillas, R., Serradell, A., Ginés, R., Tuset, V., Acosta, F., Rimoldi, S., Bajek, A., Haffray, P., Sellal, F., & Torrecillas, S. (2023). Nutritional innovations in superior European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) genotypes: Implications on

fish performance and feed utilization. *Aquaculture, 572*, 739486. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739486

Monzón-Atienza, L., Bravo, J., Serradell, A., Montero, D., Gómez-Mercader, A., & Acosta, F. (2023). Current status of probiotics in European sea bass aquaculture as one important Mediterranean and Atlantic commercial species: A review. *Animals, 13*(14), 2369. https://doi.org/10.3390/ani13142369

Morisawa, M., Hirano, T., & Suzuki, K. (1979). Changes in blood and seminal plasma composition of the mature salmon (*Oncorhynchus keta*) during adaptation to freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 64*(3), 325–329. https://doi.org/10.1016/0300-9629(79)90451-1

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., & Yasuda, K. (1983). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *The Journal of Experimental Biology, 107*(1), 95–103. https://doi.org/10.1242/jeb.107.1.95

Muchlisin, Z., Hashim, R., & Chong, A. (2004). Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa: The effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology, 62*(1–2), 25–34. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.05.006

Musa, K., T., D., & C., P. (2024). Some biochemical attributes in seminal plasma of Iraqi buffalo bulls and their relation to the semen quality. *The Iraqi Journal of Agricultural Science, 55*(2), 402–412. https://doi.org/10.36103/nrfkex70

Neyrão, I., Santos, F., Rodrigues, R., Streit, D., & Godoy, L. (2023). Use of powdered milk in semen cryopreservation protocols for fish: A systematic review. *Biopreservation and Biobanking, 21*(3), 1–13. https://doi.org/10.1089/bio.2022.0091

Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R., & Senhorini, J. A. (2006). Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology, 49*(5), 651–659. https://doi.org/10.1590/s1516-89132006000500015

Noveiri, S., Noori, A., Bahmani, M., Sadati, M., & Akbarzadeh, A. (2019). Effects of seminal plasma ionic content, pH, and osmolality on spermatozoa motility in bester (female *Huso huso* × male *Acipenser ruthenus*) sturgeon. *Iranian Journal of Fisheries Sciences, 18*(2), 395–404. https://doi.org/10.22092/IJFS.2019.118198

Numata, S., McDermott, J., Sánchez, G., Mitra, A., & Blanco, G. (2022). The sodium-glucose cotransporter isoform 1 (SGLT-1) is important for sperm energetics, motility, and fertility. *Biology of Reproduction, 106*(6), 1206–1217. https://doi.org/10.1093/biolre/ioac052

Nynca, J., Judycka, S., Liszewska, E., Dobosz, S., Krzyś, M., & Ciereszko, A. (2021). Effect of double freezing fish semen on sperm motility and fertility. *Aquaculture, 530*, 735782. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735782

Özgür, M. E., Maraş, Z., & Erdogan, S. (2019). The relationship between semen seminal plasma ions and sperm cell velocities of wild-caught longspine scraper (*Capoeta trutta*). *Archives Animal Breeding, 62*(4), 557–564. https://doi.org/10.5194/aab-62-557-2019

Park, J. Y., Zidni, I., Lee, Y. H., Lee, H. B., & Lim, H. K. (2022). Effect of long-term storage on the quality of cryopreserved sperm of the giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture, 555*, 738154. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738154

Parodi, J., Ramírez-Reveco, A., & Guerra, G. (2015). Example use of low-cost system for capturing the kinetic parameters of sperm cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *6*(2), 63–72. https://doi.org/10.4236/abb.2015.62007

Pascon, G., Messina, M., Petit, L., Valente, L., Oliveira, B., Przybyla, C., Dutto, G., & Tulli, F. (2021). Potential application and beneficial effects of a marine microalgal biomass produced in a high-rate algal pond (HRAP) in diets of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Science and Pollution Research, 28*(43), 62185–62199. https://doi.org/10.1007/s11356-021-14927-x

Peñaranda, D. S., Pérez, L., Fakriadis, G., Mylonas, C. C., & Asturiano, J. F. (2008). Effects of extenders and cryoprotectant combinations on motility and morphometry of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology, 24*(4), 450–455. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01124.x

Pereira, V., Alencar, D., Araújo, I., Rodrigues, J., Lopes, J., Nunes, L., Ferreira, Y., Lobato, J., Montenegro, A., & Vanderley, C. (2020). Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* semen. *Aquaculture, 528*, 735553. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735553

Perez, E. S., Duran, B. O. S., Zanella, B. T. T., & Dal-Pai-Silva, M. (2023). Review: Understanding fish muscle biology in the indeterminate growth species pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 285*, 111502. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.111502

Pérez, L., Gallego, V., & Asturiano, J. F. (2020). Intracellular pH regulation and sperm motility in the European eel. *Theriogenology, 145*, 48–58. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.026

Pérez, L., Asturiano, J. F., Yoshida, M., & Gallego, V. (2022). Ionic control of sperm motility and trials for the improvement of pufferfish (*Takifugu alboplumbeus*) sperm extenders. *Aquaculture, 554*, 738146. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738146

Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., & González, A. (2005). Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology, 142*(1–2), 102–110. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.011

Pinheiro, J., De Assis, C., Sanches, E., & Moreira, R. (2020). Aluminum, at an environmental concentration, associated with acidic pH and high water temperature, causes impairment of

sperm quality in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Environmental Pollution, 262*, 114252. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114252

Płaczkowska, S., Rodak, K., Kmieciak, A., Gilowska, I., & Kratz, E. (2024). Exploring correlations: Human seminal plasma and blood serum biochemistry in relation to semen quality. *PLOS ONE, 19*(3), e0305861. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305861

Rashid, I., Hossain, M. S., Salam, M. A., & Rafiquzzaman, S. M. (2019). Evaluation of seminal plasma composition and spermatozoa quality parameters of silver barb (*Barbonymus gonionotus* Bleeker, 1850). *Fish Physiology and Biochemistry, 45*(1), 105–114. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0539-4

Rodríguez-García, C., Toro-Podadera, A., Sarmiento-Carbajal, J., & Cabrera-Castro, R. (2024). Coexisting in the surf zone: Age and feeding habits of the spotted seabass (*Dicentrarchus punctatus*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) on the Gulf of Cádiz beaches (Southwest Iberian Peninsula). *Fishes, 9*(5), 173. https://doi.org/10.3390/fishes9050173

Rodríguez-Martínez, H., Martinez, E., Calvete, J., Vega, F., & Roca, J. (2021). Seminal plasma: Relevant for fertility? *International Journal of Molecular Sciences, 22*(9), 4368. https://doi.org/10.3390/ijms22094368

Rosati, S., Maiuro, L., Lombardi, S., Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Cariglia, M., Lopez, F., Cofelice, M., Tremonte, P., & Sorrentino, E. (2025). Integrated biotechnological strategies for the sustainability and quality of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Foods, 14*(6), 1020. https://doi.org/10.3390/foods14061020

Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture, 234*(1–4), 1–28. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006

Rusco, G., Di Iorio, M., Iampietro, R., Esposito, S., Gibertoni, P. P., Penserini, M., & Iaffaldano, N. (2020). A simple and efficient semen cryopreservation method to increase the genetic variability of endangered Mediterranean brown trout inhabiting Molise rivers. *Animals, 10*(3), 403. https://doi.org/10.3390/ani10030403

Salmito-Vanderley, C., Vieira, M., Leite, L., Oliveira, F., Linhares, F., Salgueiro, C., & Nunes, J. (2012). Cryopreservation extenders for fishes sperm of Characidae family. *Animal Reproduction Science, 22*, 255–268.

Sanchez, M. P., Borges, L. P., Lobato, S. I. R., Carneiro-Leite, L., Kasai, R. Y. D., Ribeiro, C. D. S., Veríssimo-Silveira, R., & Ninhaus-Silveira, A. (2024). Relationship between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the catfish *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Neotropical Ichthyology, 22*(2), e230109. https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0109

Sandoval-Vargas, L., Jiménez, M., González, J., Villalobos, E., Cabrita, E., & Isler, I. (2020). Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Reviews in Aquaculture, 13*, 365–387. https://doi.org/10.1111/raq.12479

Sarvi, K., Niksirat, H., Amiri, B., Mirtorabi, S., Rafiee, G., & Bakhtiyari, M. (2006). Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture, 256*, 564–569. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.012

Shaliutina-Kolešová, A., Dietrich, M., Xian, M., & Nian, R. (2019). Seminal plasma transferrin effects on cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) sperm and comparison with bovine serum albumin and antifreeze proteins. *Animal Reproduction Science, 204*, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.013

Shaliutina-Kolešová, A., Ashtiani, S., Xian, M., & Nian, R. (2020). Seminal plasma fractions can protect common carp (*Cyprinus carpio*) sperm during cryopreservation. *Fish Physiology and Biochemistry, 46*, 1461–1468. https://doi.org/10.1007/s10695-020-00805-9

Shaliutina-Loginova, A., & Loginov, D. (2023). Oxidative stress and DNA fragmentation in frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio*) sperm with and without supplemental proteins. *Animal Reproduction Science, 251*, 107213. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107213

Shields, R. (2001). Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture, 200*, 55–88. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00694-9

Silva, A. R., Coricni, C. D., Alves, F. P., Goes, A. C., Vieira, F. N., Streit Jr, D. P., & Godinho, H. P. (2022). Cryopreservation of pacu sperm (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Research Square*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1379415/v1

Souche, E., Hellemans, B., Babbucci, M., Mac Aoidh, E., Guinand, B., Bargelloni, L., Chistiakov, D., Patarnello, T., Bonhomme, F., Martinsohn, J., & Volckaert, F. (2015). Range-wide population structure of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Biological Journal of the Linnean Society, 116*, 86–105. https://doi.org/10.1111/bij.12572

Streit Jr, D. P., Moraes, G. V. D., Ribeiro, R. P., Sakaguti, E. S., Souza, E. D. D., Povh, J. A., & Caçador, W. (2004). Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 41*, 147–153. https://doi.org/10.1590/S1413-95962004000300001

Suquet, M., Dréanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., & Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research, 31*, 231–243. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x

Syropoulou, F., Parlapani, F., Bosmali, I., Madesis, P., & Boziaris, I. (2020). HRM and 16S rRNA gene sequencing reveal the cultivable microbiota of the European sea bass during ice storage. *International Journal of Food Microbiology, 327*, 108658. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108658

Tan-Fermin, J., Miura, T., Adachi, S., & Yamauchi, K. (1999). Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther). *Aquaculture, 171*, 323–338. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00402-5

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*, *51*(2), e20196754. https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200039

Thibaut, L., Emilie, F., Béatrice, C., Romain, G., François, R., Sophie, H., Eva, B., Jeanne, N., & Catherine, L. (2019). Are European sea bass as euryhaline as expected? Intraspecific variation in freshwater tolerance. *Marine Biology*, *166*. https://doi.org/10.1007/s00227-019-3551-z

Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F., Bargelloni, L., Power, D., Bonhomme, F., Canário, A., & Reinhardt, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications*, *5*. https://doi.org/10.1038/ncomms6770

Tsai, S., & Lin, C. (2012). Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *55*, 425–434. https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000300014

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., & Pilarski, F. (2018). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *10*, 351–369. https://doi.org/10.1111/raq.12164

Vandeputte, M., Gagnaire, P.-A., & Allal, F. (2019). The European sea bass: A key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Animal Genetics*, *50*, 195–206. https://doi.org/10.1111/age.12779

Vílchez, M. C., Morini, M., Peñaranda, D. S., Gallego, V., Asturiano, J. F., & Pérez, L. (2016). Sodium affects the sperm motility in the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *198*, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.008

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. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3

Viveiros, A. T. M., Orfão, L. H., Maria, A. N., & Allaman, I. B. (2009). A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* semen. *Animal Reproduction Science*, *112*(3–4), 293–300. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.025

Viveiros, A. T. M., Di Chiacchio, I. M., Almeida, I. L. G., & Leal, M. C. (2019). Seminal plasma features of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus* throughout two consecutive spawning seasons. *Molecular Reproduction and Development*, *86*(7), 776–785. https://doi.org/10.1002/mrd.23170

Wang, Q., Zhang, H., Ouyang, L., Hua, S., Ruan, Q., Zhang, Y., Yang, Y., & Meng, Z. (2024). Integrated sperm movement, proteomics, and phosphoproteomics elucidate the roles of

osmolality, ions, and key proteins in sperm activation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 741538. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741538

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. *Reviews in Aquaculture, 12*(2), 909–924. https://doi.org/10.1111/raq.12355

Yang, H., Daly, J., Carmichael, C., Matthews, J., Varga, Z. M., Tung, C. K. N., Snyder, J., & Yang, H. (2016). A procedure-spanning analysis of plasma membrane integrity for assessment of cell viability in sperm cryopreservation of zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish, 13*, 144–151. https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1176

Yang, S., Xu, W., Hua, Y., Ruan, Q., & Meng, Z. (2025). Incorporation of reduced glutathione to the extender improves frozen-thawed sperm function and fertility potential in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture Reports*. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102590

Yıldız, C., Bozkurt, Y., & Yavaş, İ. (2013). An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology, 67*(1), 91–94. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.008

Yilmaz, O., Prat, F., Ibáñez, A., Amano, H., Koksoy, S., & Sullivan, C. (2015). Estrogen-induced yolk precursors in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Status and perspectives on multiplicity and functioning of vitellogenins. *General and Comparative Endocrinology, 221*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.018

Yongsheng, T., Jingjing, Z., Zhentong, L., Ziqi, L., & Linna, W. (2020). Cryopreservation of marine fish sperm. In J. Betsy & S. Kumar (Eds.), *Cryopreservation of Fish Gametes* (pp. 187–210). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_9

Zhang, T., Zhang, L., Zhuang, P., Feng, G., Huang, X., & Zhao, F. (2006). Chemical composition and osmotic pressure of seminal plasma of *Oncorhynchus mykiss aguabonita* and *Anguilla japonica*. *Marine Fisheries, 28*, 1–4.

Zilli, L., & Vilella, S. (2012). Effect of cryopreservation on biochemical parameters, DNA integrity, protein profile and phosphorylation state of proteins of seawater fish spermatozoa. In I. I. Katkov (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology* (pp. 391–414). InTechOpen. https://doi.org/10.5772/32962

Zilli, L., Schiavone, R., & Vilella, S. (2017). Role of protein phosphorylation/dephosphorylation in fish sperm motility activation: State of the art and perspectives. *Aquaculture, 472*, 73–80. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.043