

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO
ESPERMÁTICA DE PACU *Piaractus
mesopotamicus* UTILIZANDO DIFERENTES
SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS**

Ana Regina Seabra de Souza

Jaboticabal, São Paulo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO
ESPERMÁTICA DE PACU *Piaractus
mesopotamicus* UTILIZANDO DIFERENTES
SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS**

Ana Regina Seabra de Souza

Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches

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

Jaboticabal, São Paulo

2022

Souza, Ana Regina Seabra de
P729p Protocolo de criopreservação espermática de pacu *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras / Ana Regina Seabra de Souza. -- Jaboticabal, 2022
81 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2022
Orientador: Eduardo Antônio Sanches
Banca examinadora: Alexandre Ninhaus Silveira, Danilo Pedro Streit Junior
Bibliografia

1. Reprodução. 2. Preservação do sêmen. 3. Fertilização. 4. Larvas. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.43

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Protocolo de criopreservação espermática de pacu *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras

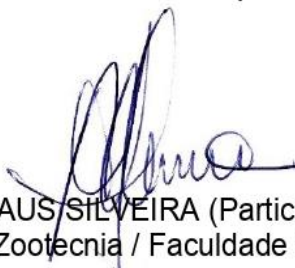
AUTORA: ANA REGINA SEABRA DE SOUZA

ORIENTADOR: EDUARDO ANTÔNIO SANCHES

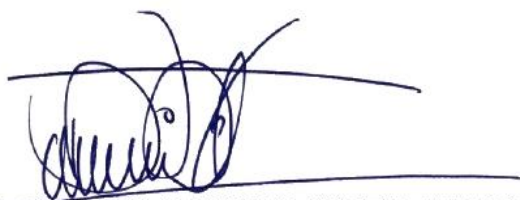
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Virtual)
Curso de Engenharia de Pesca / UNESP, Campus de Registro, Registro-SP



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



Professor Adjunto DANILO PEDRO STREIT JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre-RS

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2022

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Taxas de alterações morfológicas espermáticas obtidas dos tratamentos com espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores em comparação ao espermatozoide fresco. (A): Espermatozoides normais; (B): Cauda corrugada; (C): Cauda dobrada; (D): Cauda quebrada; (E): Gota citoplasmática. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose. 34

Figura 2. Variáveis obtidas para danos de DNA do espermatozoide criopreservado de *P. mesopotamicus* por meio do Ensaio Cometa Alcalino. A) Comprimento da cabeça (μm); B) Comprimento da cauda do cometa (μm); C) Intensidade da cabeça; D) Intensidade da cauda; (E) Momento da cauda; (F) Área total (μm^2); (G) Intensidade total. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose. 35

Figura 3. Taxas de motilidade obtidas por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoide fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose. 38

Figura 4. Velocidade curvilínea (VCL) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoide fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose. 39

Figura 5. Velocidade média da trajetória do espermatozoide (VAP) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoide fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5%

de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.
 40

Figura 6. Velocidade linear progressiva (VSL) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose..... 41

Figura 7. Retilinearidade (STR) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose..... 42

Figura 8. Progressão (PROG) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose..... 43

Figura 9. Taxas de fertilização obtidas de esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose..... 44

Figura 10. Taxas de eclosão obtidas de esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10%

de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose. 45

Figura 11. Taxas de larvas normais obtidas de esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose. 46

CAPÍTULO III

Figura 1. Parâmetros espermáticos computadorizados obtidos por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para água destilada e frutose (2,5%) utilizadas como soluções ativadoras na ativação dos pools de sêmen criopreservados de *P. mesopotamicus*. (A): Motilidade; (B) Velocidade curvilinear (VCL); (C) Velocidade média da trajetória (VAP); (D) Velocidade em linha reta (VSL). Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias T-student. 71

Figura 2. Taxas de fertilização obtidas dos três pools de sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservados utilizando MET 10% + FRU 5,0% como crioprotetores comparados ao esperma fresco. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Crio 1: Pool 1; Crio 2: Pool 2; Crio 3: Pool 3. 72

Figura 3. Número de larvas normais estimadas por incubadora obtidas dos três pools de sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservados utilizando MET 10% + FRU 5,0% como crioprotetores comparados ao esperma fresco. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Crio 1: Pool 1; Crio 2: Pool 2; Crio 3: Pool 3. 72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Tratamentos compostos por crioprotetores e suas respectivas concentrações utilizados para o processo de congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus*. 29

Tabela 2. Parâmetros espermáticos e seminal fresco (média $\pm$ desvio padrão) de *P. mesopotamicus*. 31

Tabela 3. Resultados dos parâmetros de morfologia espermática (média $\pm$ desvio padrão) referentes aos tratamentos contendo propilenoglicol e metilglicol como crioprotetores internos na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*. 32

Tabela 4. Resultados dos parâmetros espermáticos (média $\pm$ desvio padrão) referentes aos tratamentos contendo propilenoglicol e metilglicol como crioprotetores internos na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*. 37

Tabela 5. Taxas de fertilização, eclosão e larvas normais (média $\pm$ desvio padrão) obtidas da fertilização artificial de esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* por meio de três diferentes machos utilizados. 44

CAPÍTULO III

Tabela 1. Parâmetros medidos de qualidade da água (média $\pm$ desvio padrão) utilizada na fertilização e incubação dos ovos de *P. mesopotamicus*. 67

Tabela 2. Parâmetros espermáticos computadorizados (média $\pm$ desvio padrão) dos sêmens fresco (pré-congelamento) e criopreservado (pós-congelamento) de *P. mesopotamicus*. 68

Tabela 3. Parâmetros espermáticos computadorizados (média $\pm$ desvio padrão) do pool de sêmen fresco proveniente de três machos utilizado no processo de fertilização de *P. mesopotamicus*. 69

Tabela 4. Parâmetros espermáticos computadorizados (média $\pm$ desvio padrão) de água destilada e frutose (2,5%) utilizadas como soluções ativadoras para o sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*, obtidos de três pools de sêmen provenientes de três machos. 70

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	X
APOIO FINANCEIRO	xi
RESUMO GERAL	12
GENERAL ABSTRACT	13
PRÊAMBULO	14
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO II – Artigo	21
Protocolo de criopreservação espermática de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> utilizando diferentes soluções crioprotetoras.....	21
RESUMO	21
1. Introdução.....	22
2. Material e Métodos	24
2.1. Seleção dos reprodutores.....	24
2.2. Indução hormonal.....	25
2.3. Coleta de dados	25
2.3.1. Machos.....	25
2.3.2. Fêmeas	28
2.4. Delineamento experimental	28
2.5. Análise estatística.....	30
3. Resultados.....	31
4. Discussão	46
5. Conclusão.....	52
Referências.....	52
CAPÍTULO III – Artigo	60
É possível produzir larvas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> em escala comercial utilizando sêmen criopreservado em tubos criogênicos?	60
RESUMO	60
1. Introdução.....	61
2. Material e Métodos	63
2.1 Seleção dos reprodutores.....	63
2.2 Indução hormonal.....	64
2.3 Coleta de dados	64
2.3.1 Machos.....	64
2.3.2 Fêmeas	66
2.4 Delineamento experimental	66
2.5. Análise estatística.....	67
3. Resultados.....	68
4. Discussão	73
5. Conclusão.....	76
Referências.....	76

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Rizoneide e Washington, minha irmã Camila e meu filho Pedro Henrique por todo apoio, força, incentivo e dedicação que me fizeram alcançar mais esse objetivo.

Aos meus pais Neia e Eliel pelos conselhos sempre quando foi preciso e necessário.

Ao meu professor orientador Dr. Eduardo Antônio Sanches por todo apoio, conhecimento, experiência, dedicação e incentivo passados durante 4 anos trabalhando em conjunto em projetos de pesquisa.

A 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 *Fish Reproduction Research Group* da UNESP de Registro/SP pela ajuda na realização deste trabalho, em especial a Júlia Pohl, Luciana Nascimento, Janaína Valandro, Vinícius Mecca e Cintia Araujo.

Ao laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências) da Unesp de Botucatu/SP pela auxílio na realização das análises dos danos de DNA.

Ao *Reproductive and Molecular Biology Group* da UNESP de Botucatu/SP pela disposição do laboratório e materiais para realização das análises de danos de DNA em especial ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nobrega, Daniel e Maira.

A Universidade Estadual Paulista pela disponibilidade dos materiais e do laboratório de Aquicultura para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) pelos ensinamentos transmitidos durante esses 2 anos de pós-Graduação.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

APOIO FINANCEIRO

CAPES – Processo nº 88887.486388/2020-00

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

RESUMO GERAL

A criopreservação é uma técnica que proporciona inúmeras vantagens tanto para piscicultura no intuito de auxiliar de forma prática a produção de espécies de interesse comercial e potencial econômico, bem como na reposição de espécies ameaçadas de extinção. Esta dissertação é composta por resultados obtidos de dois experimentos distintos. O primeiro teve como objetivo principal avaliar a eficiência dos crioprotetores intracelulares (metanol, propilenoglicol e metilglicol) combinados com os crioprotetores extracelulares (glicose, sacarose e frutose) no processo de criopreservação espermática de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). O segundo experimento teve como objetivo principal foi avaliar a aplicabilidade prática da solução crioprotetora mais eficiente resultante do primeiro experimento no processo fertilização artificial com sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* em escala comercial utilizando-se de tubos criogênicos de 2,0 mL. Os estudos realizados demonstraram eficiência da solução contendo 10% de metanol + 5% de frutose na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*, proporcionando características espermáticas satisfatórias para a produção de larvas da espécie, sendo possível sua aplicação em escala comercial com o uso de tubos criogênicos de 2,0mL como material de armazenamento do sêmen para o congelamento e frutose (2,5%) como solução ativadora.

Palavras-chave: Reprodução, sêmen, congelamento, fertilização

GENERAL ABSTRACT

Cryopreservation is a technique that has numerous advantages, not so much for fish farming to help in a practical way the production of species of commercial interest and economic potential, as for the replacement of endangered species. This dissertation is composed of results obtained from two different experiments. The first one had as main objective to evaluate the efficiency of intracellular cryoprotectants (methanol, propylene glycol and methyl glycol) combined with extracellular cryoprotectants (glucose, sucrose fructose) in the process of sperm cryopreservation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). The second experiment aimed to evaluate the practical applicability of the cryoprotectant solution most efficient resulting from the first experiment in the process of artificial fertilization with cryopreserved sperm of *P. mesopotamicus* in commercial scale using 2.0 mL cryogenic tubes. The studies used showed efficiency in the solution contained 10% of methanol + 5% of fructose on sperm cryopreservation of *P. mesopotamicus*, providing satisfactory sperm characteristics to larvae production of this species, and with possibility of the commercial scale application after 2.0mL cryogenic tube as storage material and the fructose (2.5%) as sperm activator.

Key-words: Reproduction, semen, freezing, fertilization

PRÊAMBULO

A presente dissertação é composta por resultados obtidos de dois experimentos distintos, aos quais deram origem a dois artigos, sendo eles apresentados como capítulo 02 intitulado “**Protocolo de criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras**” e o capítulo 03 intitulado “**É possível produzir larvas de *Piaractus mesopotamicus* em escala comercial utilizando sêmen criopreservado em tubos criogênicos?**”.

Para a presente defesa, optou-se por apresentar os resultados de ambos os experimentos em forma de artigo científico adequado sob as normas da revista Aquaculture.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

Como a pesca não atende ao consumo mundial de pescado, a demanda pela indústria da aquicultura para fornecimento desta produção vem aumentando ano após ano (HUNTER e ROBERTS, 2000). De acordo com a FAO (2020), a pesca extrativista e a aquicultura mundial proveram aproximadamente 178,5 milhões de toneladas de pescado, sendo 156,4 mil toneladas para consumo humano em 2018, com a produção de peixes continentais representando 62,3% do total produzido pela aquicultura. No Brasil, segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura, a produção estimada da piscicultura no Brasil em 2021 foi de 841 mil toneladas, com um crescimento de 4,7% sobre a produção de 2020, sendo 31,2% representados por peixes nativos (Peixe BR, 2022).

Para otimizar o processo de produção de peixes, técnicas de grande interesse para piscicultura podem ser utilizadas a fim de auxiliar de forma prática a produção de espécies de interesse comercial e potencial econômico. A criopreservação é um exemplo de técnica que pode ser utilizada rotineiramente em laboratórios de reprodução, que possibilita o armazenamento do material genético em nitrogênio líquido a -196°C , conservando-se a estrutura, funcionalidade das células e tecidos vivos, tornando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inativos do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007).

Sua aplicação proporciona inúmeras vantagens, tais como, a eliminação do problema causado pela assincronia da maturidade gonadal entre machos e fêmeas; a praticidade do manejo dos reprodutores em que pode-se trabalhar com machos e fêmeas separadamente em momentos distintos; a facilidade de transporte do material genético entre as pisciculturas, o que evita o transporte de animais vivos e influencia positivamente nos custos da produção; o estabelecimento de programas de hibridização com peixes de diferentes períodos reprodutivos (VIVEIROS, 2005; MARIA et al., 2009) e a formação de bancos de germoplasma que permite a manutenção da diversidade genética e a reposição de espécies ameaçadas de extinção (VIVEIROS et al., 2009, MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2009).

Para obter sucesso na criopreservação, são utilizadas soluções crioprotetoras específicas que irão atuar como soluções substitutas da água presente no meio intracelular, por meio de gradiente osmótico, no qual irão

realizar a desidratação parcial da célula, reduzindo o limiar de congelamento e evitando que cristais de gelo se formem nas camadas internas e externas da célula, protegendo-a dos danos causados pelas baixas temperaturas (ROSATO e IAFFALDANO, 2013; NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003). Sabe-se que estas soluções possuem função de proteção contra a exposição à baixas temperaturas em que as células são submetidas, no entanto, podem causar danos osmóticos e toxicidade (GUAN et al., 2010).

Os agentes crioprotetores são classificados como intracelulares (permeáveis) e extracelulares (não permeáveis). Os agentes crioprotetores intracelulares foram classificados em dois grupos, alcoólicos e amidas (ASHWOOD-SMITH, 1987) e são representados por 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). Neste trabalho, os crioprotetores internos foram representados pelos álcoois, tais como o metanol, propilenoglicol e metilglicol que tem como função evitar a formação de cristais de gelo que comprometem a integridade da membrana espermática interna durante as mudanças de temperatura. Do ponto de vista físico-químico, os crioprotetores intracelulares são responsáveis por atuar através de suas propriedades coligativas, na redução do ponto crioscópico intracelular, na qual irá favorecer um ambiente menos deletério a célula espermática durante a congelação (WATSON, 1995). Os agentes crioprotetores extracelulares são representados por substâncias de alto peso molecular que não conseguem penetrar no interior da célula, portanto, irão atuar na proteção externa da célula (FAHY, 2010). São representados por açúcares complexos, tais como a glicose, sacarose e frutose, que atuam por efeito osmótico estimulando a saída de água intracelular e por se caracterizarem como compostos hidrofílicos, estas substâncias irão se ligar às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução prevenindo a formação de cristais de gelo (FAHY, 2007; AMANN e PICKETT, 1987). Além disso, os crioprotetores extracelulares atuam na regulação da motilidade espermática, na osmolaridade do plasma seminal e possuem efeito direto na ativação espermática (BILLARD e COSSON, 1992).

Dentre as espécies nativas brasileiras, o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1877) (CHARACIFORMES:SERRASALMIDAE) é um peixe

altamente utilizado na aquicultura e repovoamento de reservatórios hidrelétricos no Brasil. O interesse econômico pela espécie ocorreu devido ao seu alto valor comercial, 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, alguns protocolos dependem da padronização determinadas por diluentes e crioprotetores mais eficazes, com objetivo de manter a alta qualidade espermática. Devido a variação das características do sêmen entre as espécies, tais como morfologia e fisiologia, ocorre a necessidade do desenvolvimento de protocolos para a criopreservação de sêmen personalizados (LAHNSTEINER et al., 1995; GLOGOWSKI et al., 1999).

Contudo, estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após a aplicação criopreservação espermática. Para espécies de interesse comercial e potencial econômico como o *P. mesopotamicus*, a criopreservação do sêmen pode contribuir para a conservação de material genético da espécie e favorecer sua produção e comercialização.

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>.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.41, p.395-406, 1987.

AMANN, R. P., PICKETT, B. W. 1987. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-174. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).

BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 22-31, 1992.

FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709-714, 2007. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60672-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60672-4).

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p.45-53, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

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.

GLOGOWSKI, J.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. 1999. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. **North American Journal of Aquaculture**, v. 61, p.258-262. <https://doi.org/1811/37298>

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, London, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.001>.

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).

HUNTER, B. J., ROBERTS, D. C. K. 2000. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. **Nutrition Research**, v.20, n.7, p.1047-1058. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00181-0).

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. 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta* f. *fario* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp. **Aquaculture Research**, v.26, p.801-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00873.x>.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, M. (Org.). *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. 1 ed. Amapá: Embrapa Amapá, 2009, v.1, p.47-63.

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>.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

PEIXE BR - Associação Brasileira de Piscicultura. Anuário Brasileiro da Piscicultura. São Paulo: Peixe BR. 152p. 2022.

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.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HÉRRÆEZ, M. P. 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 47, n. 1, p. 30-39. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00066-X).

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>.

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

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, GO. Palestras..., 2005.

VIVEIROS, A. T.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.293-300. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.025>.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, n.4, p. 871- 891. 1995.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1: Avaliar a eficiência dos crioprotetores intracelulares (metanol, propilenoglicol e metilglicol) combinados com os crioprotetores extracelulares (glicose, sacarose e frutose) no processo de criopreservação espermática e fertilização artificial de *P. mesopotamicus*;

2: Avaliar parâmetros reprodutivos do sêmen fresco pré-congelamento por meio de análises de morfologia, concentração e motilidade espermática;

3: Avaliar parâmetros reprodutivos do sêmen criopreservado por meio de análises de morfologia, concentração e motilidade espermática e danos no DNA;

4: Avaliar a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado por meio de parâmetros reprodutivos de fertilização, eclosão e larvas normais;

4: Avaliar a eficiência da solução crioprotetora composta por metanol e frutose, ativadas em frutose no processo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus* em escala comercial utilizando-se de tubos criogênicos;

5: Avaliar a eficiência da frutose como solução ativadora do sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*.

CAPÍTULO II – Artigo

Protocolo de criopreservação espermática de pacu *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras*

RESUMO

A criopreservação é uma técnica de grande interesse para piscicultura que pode ser utilizada rotineiramente em laboratórios de reprodução. No entanto, alguns gargalos na reprodução ainda são visíveis, onde estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após a aplicação desta técnica. O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras. Para o congelamento do sêmen foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado composto por 18 tratamentos e três repetições (machos). As soluções foram compostas por crioprotetores intracelulares na concentração de 10% (metanol, propilenoglicol e metilglicol), as extracelulares nas concentrações de 5,0 e 7,5% (glicose, sacarose e frutose) e água destilada como solução diluidora e submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido. Para os dados de morfologia dos espermatozoides, verificou-se diferença ($P < 0,05$) sob todos os tratamentos comparados ao esperma fresco. Verificou-se efeito ($P < 0,05$) sob os parâmetros espermáticos obtidos das soluções contendo os crioprotetores internos propilenoglicol e metilglicol, no qual apresentaram-se inferiores ($P < 0,05$) ao esperma fresco. Para os resultados dos parâmetros espermáticos computadorizados avaliados, foi verificada diferença ($P < 0,05$) dos crioprotetores em relação ao esperma fresco. Ao avaliar o efeito dos crioprotetores sobre as taxas de fertilização, eclosão e larvas normais para cada macho, verificou-se efeito ($p < 0,05$) em todos os parâmetros. No entanto, afirma-se que soluções contendo MET 10% + FRU 5,0% apresenta eficácia para criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*, proporcionando características espermáticas satisfatórias para a produção de larvas da espécie.

Palavras-chave: Reprodução, sêmen, congelamento, fertilização

* Artigo escrito sob as normas da Revista Aquaculture

1. Introdução

A criopreservação é um exemplo de técnica que pode ser utilizada rotineiramente em laboratórios de reprodução, que possibilita o armazenamento do material genético em nitrogênio líquido a -196°C , conservando-se a estrutura, funcionalidade das células e tecidos vivos, tornando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inativos do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007).

Sua aplicação proporciona inúmeras vantagens, tais como, a eliminação do problema causado pela assincronia da maturidade gonadal entre machos e fêmeas; a praticidade do manejo dos reprodutores em que pode-se trabalhar com machos e fêmeas separadamente em momentos distintos; a facilidade de transporte do material genético entre as pisciculturas, o que evita o transporte de animais vivos e influencia positivamente nos custos da produção; o estabelecimento de programas de hibridização com peixes de diferentes períodos reprodutivos (VIVEIROS, 2005; MARIA et al., 2009) e o auxílio no desenvolvimento de programas de conservação de espécies de peixes por meio de bancos de germoplasma que permite a manutenção da diversidade genética (VIVEIROS et al., 2009, MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2009).

Para obter sucesso na criopreservação, são utilizadas soluções crioprotetoras específicas que irão atuar como soluções substitutas da água presente no meio intracelular, por meio de gradiente osmótico, no qual irão realizar a desidratação parcial da célula, reduzindo o limiar de congelamento e evitando que cristais de gelo se formem nas camadas internas e externas da célula, protegendo-a dos danos causados pelas baixas temperaturas (ROSATO e IAFFALDANO, 2013; NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003). Sabe-se que estas soluções possuem função de proteção contra a exposição à baixas temperaturas em que as células são submetidas, no entanto, podem causar danos osmóticos e toxicidade (GUAN et al., 2010). Além disso, outro fator importante a ser considerado é a velocidade de redução da temperatura durante o congelamento, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (WATSON, 1995).

Os agentes crioprotetores são classificados como intracelulares (permeáveis) e extracelulares (não permeáveis). Os agentes crioprotetores intracelulares são classificados em dois grupos, alcoólicos e amidas (ASHWOOD-SMITH, 1987) e são representados por 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). Neste trabalho, os crioprotetores internos foram representados pelos álcoois, tais como o metanol, propilenoglicol e metilglicol que

tem como função evitar a formação de cristais de gelo que comprometem a integridade da membrana espermática interna durante as mudanças de temperatura. Do ponto de vista físico-químico, os crioprotetores intracelulares são responsáveis por atuar através de suas propriedades coligativas, na redução do ponto crioscópico intracelular, na qual irá favorecer um ambiente menos deletério a célula espermática durante a congelação (WATSON, 1995). Os agentes crioprotetores extracelulares são representados por substâncias de alto peso molecular que não conseguem penetrar no interior da célula, portanto, irão atuar na proteção externa da célula (FAHY, 2010). São representados por açúcares complexos, tais como a glicose, sacarose e frutose, que atuam por efeito osmótico estimulando a saída de água intracelular e por se caracterizarem como compostos hidrofílicos, estas substâncias irão se ligar às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução prevenindo a formação de cristais de gelo (FAHY, 2007; AMANN e PICKETT, 1987). Além disso, os crioprotetores extracelulares atuam na regulação da motilidade espermática, na osmolaridade do plasma seminal e possuem efeito direto na ativação espermática (BILLARD e COSSON, 1992).

Dentre as espécies nativas brasileiras, o *P. mesopotamicus* (Holmberg, 1877) (CHARACIFORMES:SERRASALMIDAE) é um peixe altamente utilizado na aquicultura e repovoamento de reservatórios hidrelétricos no Brasil. O interesse econômico pela espécie ocorreu devido ao seu alto valor comercial, 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, alguns protocolos dependem da padronização determinadas por diluentes e crioprotetores mais eficazes, com objetivo de manter a alta qualidade espermática. Devido a variação das características do sêmen entre as espécies, tais como morfologia e fisiologia, ocorre a necessidade do desenvolvimento de protocolos para a criopreservação de sêmen personalizados (LAHNSTEINER et al., 1995; GLOGOWSKI et al., 1999).

Assim, estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após a aplicação do processo de criopreservação espermática. Streit Jr et al. (2006) conservaram sêmen de *P. mesopotamicus* utilizando 20% gema de ovo + 5% glicose + 10% Dimetilsulfóxido e quatro soluções utilizadas para sêmen de suínos. Como resultado, os autores relataram

que os meios testados em seus estudos não apresentaram-se eficientes para a espécie. Galo et al. (2019) avaliaram a qualidade do sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus* sobre as taxas de fertilização, eclosão e normalidade das larvas, e, concluíram que o processo de criopreservação afetou negativamente os parâmetros espermáticos desta espécie. Estes estudos evidenciam a necessidade de aprimoramento da técnica de criopreservação. A mescla de interesses científicos, comerciais e disponibilidade de animais permitem que hajam estudos voltados à espécies de interesse comercial e potencial econômico, como é o caso do *P. mesopotamicus*, em que a criopreservação e do sêmen pode contribuir para a conservação de material genético da espécie e aplicar em processo de produção de híbridos interespecíficos.

Neste sentido o objetivo do estudo foi avaliar protocolos de criopreservação espermática e fertilização artificial para *P. mesopotamicus*, combinando crioprotetores intracelulares (metanol, propilenoglicol e metilglicol) com crioprotetores extracelulares (glicose, sacarose e frutose).

2. Material e Métodos

Os reprodutores de *P. mesopotamicus* foram provenientes do plantel de reprodutores do setor de piscicultura da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Regional do Vale do Ribeira, Pariquera-Açú, São Paulo, Brasil e o experimento desenvolvido no Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira (FCAVR) da Unesp, Registro, São Paulo, Brasil.

2.1. Seleção dos reprodutores

Para o experimento, foram utilizados nove reprodutores de *P. mesopotamicus* com idade de cinco anos. Por meio de massagem no sentido encéfalo-caudal, foi selecionado seis machos que liberaram esperma mediante a pressão abdominal e três fêmeas que apresentaram característica secundária reprodutiva para a espécie: abdômen abaulado e papila genital avermelhada. Previamente ao experimento, os exemplares foram mantidos em viveiros escavados (900m³) em sistema intensivo; 5 a 10% de renovação diária de água; em fotoperíodo natural; 0,13 kg m⁻³ de densidade de peixes e alimentação duas vezes por semana com 1% de biomassa de peixes com 28% de ração de proteína bruta (regime alimentar aplicado na rotina da piscicultura). Os exemplares foram em seguida transportados para o laboratório e pesados os machos ($\bar{X}=2327,3\pm188,6$ g) e as fêmeas ($\bar{X}=3261,7\pm254,5$ g), identificados e posteriormente separados por sexo em caixas d'água

circulares (0,5 m³, com 1,24m de diâmetro), com aeração constante por meio de bombas de aeração. Com intuito de obter um volume de sêmen mais elevado que o natural e promover a maturação final dos oócitos para fertilização, os peixes foram submetidos ao protocolo de indução hormonal.

2.2. *Indução hormonal*

Foi utilizado o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) diluído em solução salina (NaCl 0,9% - 0,5mL Kg⁻¹), com duas dosagens para fêmeas (0,5 e 5,0mg de EBHC kg⁻¹ - intervalo de 12 horas) e apenas uma para machos de (2,5 mg EBHC kg⁻¹), que ocorreu trinta minutos antes da segunda dosagem das fêmeas (GALO et. al 2019). Após indução, parâmetros de qualidade da água foram mensurados: potencial hidrogeniônico (pH): 7,33±0,06; oxigênio dissolvido (mg/L): 7,29±0,94; amônia (ppm): 0,25 e temperatura (°C): 24°C±0,17.

2.3. *Coleta de dados*

2.3.1. *Machos*

Os exemplares foram selecionados individualmente, contidos e secos com tecido de algodão e papel toalha para coleta dos gametas, que ocorreu através de massagem na região abdominal no sentido encéfalo-caudal após 240 horas-grau a 24,5°C. A primeira gota de sêmen coletada foi descartada com o intuito de evitar contaminação pela presença de urina. O restante do sêmen foi armazenado em tubo de ensaio graduado Falcon (±0,1 mL) e alocados em pequenos recipientes em caixas de isopor contendo gelo e conservados a temperatura de 15°C (SANCHES et al., 2015) por aproximadamente duas horas para posterior análises dos parâmetros espermáticos e processo de congelamento do sêmen.

Para a avaliação da qualidade espermática, foi realizada uma avaliação subjetiva prévia de motilidade do sêmen de cada macho. O material seminal de três machos selecionados (acima de 90% de motilidade) foram utilizados individualmente para o processo de congelamento de sêmen e avaliação em triplicata dos parâmetros espermáticos de morfologia, concentração e motilidade.

Para avaliação e mensuração das taxas de alterações morfológicas, uma amostra de sêmen de cada tratamento foi fixada (1:500) em formol salino tamponado (4,6%) contendo 5 µL do corante Rosa Bengala (STREIT JR et al., 2004), para posterior processamento das lâminas conforme Sanches et al. (2015) em que avaliou-se 100 células

(sêmen *in natura*) e 200 células (sêmen criopreservado) por área em microscópio de luz em objetiva de 60X, classificados em espermatozoides normais e defeituosos de acordo com Streit Jr et al. (2009).

A concentração espermática foi estimada com base na contagem de células em câmara hematómica de Neubauer conforme Mylonas et al. (1997) e Sanches et al. (2011a) calculado conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) para sêmen de mamíferos.

Os danos de DNA foram analisados por meio de ensaio cometa alcalino baseado no método descrito por Enciso et. al (2009) com algumas adaptações. Foram analisados os tratamentos que obtiveram melhores resultados para taxas de motilidade pós-descongelamento (5 tratamentos x 3 machos), em triplicata (n=45). Primeiramente, lâminas foram recobertas com uma primeira camada de agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen) com ponto de fusão normal (PFN – 20 mL PBS para 0,3g de agarose) em banho-maria a 60°C, posteriormente alocadas em geladeira por dez minutos para solidificação. Logo após, as lâminas de agarose (PFN) foram recobertas por uma segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão (BPF- UltraPure Agarose Low Melting point, Invitrogen), juntamente com as amostras (50 µL) de cada amostra de sêmen criopreservado previamente descongelados em banho-maria (60°C-4s), misturadas em 75 µL de agarose (BPF), cobertas por lamínula e levadas novamente à geladeira (4°C) para solidificação da segunda camada. As lâminas montadas, após a retirada da lamínula, foram mantidas na horizontal e gotejado 1 mL de solução de lise 1 [0,04 mol/l Tris-HCl, 0,04 mol/l ditioneitol (DTT), 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS = sodium lauryl sulfate) e 1% de Triton, pH 7,5] no qual foram mantidas submersas na mesma solução por trinta minutos. O mesmo procedimento foi realizado para solução de lise 2 (NaCl: 146,1g; EDTA: 37,2g; Tris: 1,2g; N-Lauroyl-Sarcosine: 10g; Água deionizada: 1L). Após as etapas de lise, as lâminas foram lavadas em solução tampão fosfato (PBS) 10X (KH₂PO₄: 6g; NaH₂PO₄: 11,5g; NaCl: 8,0g; Água deionizada: 1L) na proporção de 1:9 (PBS:água) por dez minutos. Posteriormente, os nucleóides foram desenrolados em solução alcalina (NaOH 0,03 mol/l, NaCl 1 mol/l) por três minutos, para posterior etapa de eletroforese (corrida). Para isso, uma cuba de eletroforese foi envolvida em gelo e calibrada com auxílio de um nível. As lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba, preenchida com solução de corrida (NaOH 0,03 mol/L; água deionizada) e deixadas em descanso por quatro minutos (1 volt/cm e 12 mA). Em seguida, foi realizada etapa de neutralização das lâminas com (0,4 mol/l Tris-HCl, pH 7,5) por cinco minutos, submersas

em álcool 100% por dois minutos e secas ao ar para posterior análises das lâminas. Ao final, as lâminas foram coradas com 80 μL de solução de SYBR® Gold e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus) em objetiva de 40X com o software Comet Assay I. Foram contadas um total de 25 células por lâmina, onde alguns tratamentos resultaram em mais células contadas por conta da confecção das lâminas, que impediu a contagem de repetição de alguns tratamentos. As variáveis avaliadas pelo programa foram: Head Length (μm), Tail Length (μm), Head Intensity, Tail Intensity, Tail Moment, Total Area (μm^2) e Total Intensity.

A motilidade dos espermatozoides foi avaliada por método computadorizado com software de código aberto (WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2007), com o objetivo de reduzir a subjetividade e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento das células (AMANN e KATZ, 2004). A partir de então, foi possível multiplicar a média dos valores das taxas de motilidade com a concentração espermática, tendo como produto a concentração de espermatozoides móveis por mL. Para isso, após o processo de ativação (1:700 - sêmen: água destilada) os vídeos (100fps) foram gravados com auxílio de uma câmera Basler acA640-120gc (<http://www.baslerweb.com>), rapidamente levados a um microscópio de luz trinocular (SolaristBel) em objetiva 10x, conectado ao computador (CPU intel core i5 © 1,6 GHz, 8 GB de Ram) com sistema operacional Microsoft Windows 10 ©. As análises foram realizadas 5s pós-ativação (0,25s - 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), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e progressão (PROG). Para isso, as configurações utilizadas no programa foram: a=1, b=60, c=25, d=12, e=3, f=10, g=15, h=5, i=1, j=10, k=15, l=25, m=80, n=80, o=50, p=60, q=100, r=561.7978, s=0, t=0, u=0); adaptado para a espécie conforme sugerido por Neumann et al. (2013).

Para o congelamento das amostras, o material seminal dos três machos foi diluído individualmente em diferentes soluções crioprotetoras (pH 7,4 $\pm$ 0,07), as intracelulares na concentração de 10% (metanol, propilenoglicol e metilglicol), as extracelulares nas concentrações de 5,0 e 7,5% (glicose, sacarose e frutose) e água destilada como solução diluidora, na proporção de 1:9 (sêmen:solução crioprotetora). Em seguida, em uma caixa de isopor resfriada com gelo (15°C) o material foi envasado em quatro palhetas (0,5 mL) por tratamento, com tempo de equilíbrio de quinze minutos, dividido em globlets, alocado em vinte e oito racks e em seguida alocados em vapor de nitrogênio em um container

criogênico do tipo *Dry shipper* (YDH-8-80/8 litros) a -170°C durante doze horas. Após, as palhetas foram transferidas para um container “tipo líquido” (XT20/40 litros) onde foram armazenadas e congeladas em nitrogênio líquido a -196°C por vinte e quatro horas.

Após 24 horas de congelamento das amostras, uma palheta de cada tratamento aplicado foi retirada individualmente e imersa imediatamente em banho-maria por 4 segundos/ 60°C para descongelamento, adaptado de Paulino et al. (2012). Em seguida, as amostras descongeladas foram submetidas à análise de motilidade espermática e as que obtiveram melhores resultados de motilidade foram submetidas ao processo de fertilização.

2.3.2. Fêmeas

O protocolo de extrusão manual para obtenção dos gametas das fêmeas foi semelhante à dos machos onde coletou-se ($\bar{x}=3261,7\pm 254,5$ g) oócitos das três fêmeas. Uma amostra de 20g de oócitos de cada fêmea foi coletado para formar um “pool” para avaliação da taxa de fertilização. Para isso, foram retiradas três amostras de 0,1 grama para estimativa da quantidade de oócitos por grama de pool.

A fim de garantir uma máxima fertilidade e uma melhora significativa nas taxas de fertilização, aplicou-se a proporção padrão de espermatozoide por oócito (dose inseminante) conforme Sanches et al. (2011b), porém utilizando a motilidade espermática obtida com o CASA para aplicar o número móveis de espermatozoides/oócito. Para isso, foi mensurada a concentração espermática de cada amostra de sêmen criopreservado, onde aplicou-se a proporção de sêmen fresco e criopreservado (sêmen:oócito:água), igual para cada amostra de oócito.

2.4. Delineamento experimental

Para o congelamento do sêmen foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado composto por 18 tratamentos e três repetições (machos). As soluções foram compostas por crioprotetores: a) intracelulares na concentração de 10% (metanol, propilenoglicol e metilglicol) (Synth®) extracelulares nas concentrações de 5,0 e 7,5% (glicose, sacarose e frutose) (Synth®) e diluídos em água destilada (Tabela 1).

Para a fertilização, as doses hormonais foram aplicadas em relação à ordem de coleta onde o sêmen dos animais foram coletados previamente aos oócitos para evitar a perda da viabilidade dos oócitos após a coleta (SANCHES et al., 2014). Para isso, os ovos foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado

utilizando-se sêmen criopreservado com a combinação de cinco soluções crioprotetoras, compondo os tratamentos (T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose), e como controle um tratamento formado por um “pool” de sêmen de três machos não congelados, em triplicata (n=48). Foi considerada como uma unidade experimental uma incubadora (peneira - Ø 6cm) de prolipropileno com tela (0,5 mm) contendo um volume de 0,1 mL de oócitos do “pool” obtido das três fêmeas. As unidades experimentais (incubadoras) foram distribuídas aleatoriamente em uma estrutura de isopor previamente instalada em duas caixas d’água de 500 litros com aeração constante, aos quais garantiam a hidratação contínua dos ovos até o momento da eclosão das larvas.

Tabela 1. Tratamentos compostos por crioprotetores e suas respectivas concentrações utilizados para o processo de congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus*.

Tratamentos	Crioprotetor interno	Crioprotetor externo
T1	MET 10%	GLI 5 %
T2		GLI 7,5 %
T3		SAC 5%
T4		SAC 7,5 %
T5		FRU 5%
T6		FRU 7,5%
T7	PROP 10%	GLI 5 %
T8		GLI 7,5 %
T9		SAC 5%
T10		SAC 7,5 %
T11		FRU 5%
T12		FRU 7,5%
T13	METIL 10%	GLI 5 %
T14		GLI 7,5 %
T15		SAC 5%
T16		SAC 7,5 %
T17		FRU 5%
T18		FRU 7,5%

MET (Metanol); PROP (Propilenoglicol); METIL (Metilglicol); GLI (Glicose); SAC (Sacarose); FRU (Frutose).

Oito horas após a fertilização (fechamento do blastóporo – 24,5°C) (Weber et al., 2012; Amorim et al., 2009), todos os ovos de todas as incubadoras foram individualmente retirados para estimativa das taxas de fertilização (TF) ($\bar{x}$ =140 ovos/incubadora). Os ovos foram alocados em câmaras de vidro e classificados em: os ovos fertilizados (OF) (translúcidos e com desenvolvimento embrionário normal) e não fertilizados (NF) (opacos ou brancos), avaliados por meio da fórmula: $TF (\%) = 100 * (OF / (OF + NF))$.

A eclosão das larvas ocorreram aproximadamente doze horas após a fertilização, e de cada unidade experimental, todas as larvas (LA) foram removidas e contabilizadas em estereomicroscópio binocular (objetiva de 10X) para estimativa das taxas de eclosão (TE), através da fórmula: $TE (\%) = 100 * (LA / \text{Número total de ovos de cada incubadora})$.

As larvas foram classificadas em relação à sua morfologia, onde aquelas que não apresentaram nenhum tipo de alteração morfológica foram considerados normais (LN), e as que apresentaram alterações ou deformidades como alterações na nadadeira caudal e dificuldade na movimentação foram consideradas como larvas defeituosas (LD), avaliadas pela fórmula: $LN (\%) = 100 * (LN / (LN + LD))$.

2.5. Análise estatística

Após obtenção dos resultados das taxas de motilidade do esperma descongelado, optou-se pela divisão das análises. Primeiramente, para os tratamentos com soluções apresentando taxas de motilidade pós-descongelamento inferiores à 5% de significância, considerou-se os machos como fator repetição, aos quais foram submetidos à análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) ao mesmo nível. Em caso de efeito dos tratamentos, foi aplicada análise de comparação de médias de Tukey, devido à disparidade do número de médias entre os parâmetros, ao nível de 5% de significância. Para os tratamentos com motilidades superiores à 5% de significância, avaliou-se os machos separadamente, considerando as avaliações realizadas em triplicata como repetições. Cada macho foi submetido à análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) ao nível de 5% de significância. Em caso de efeito dos tratamentos, foi aplicada análise de comparação de médias de Tukey ao mesmo nível.

As análises de morfologias espermáticas foram realizadas individualmente com os diferentes machos utilizados aos quais foram submetidos à análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) ao nível de 5% de significância. Em caso de efeito dos tratamentos, foi aplicada análise de comparação de médias de Duncan ao mesmo nível.

Para os dados de danos de DNA, foi realizada uma média de todas as variáveis aos quais foram submetidas à análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância. Em caso de dados não paramétricos, foi realizado teste de comparação de Kruskal-Wallis.

Para as taxas de fertilização, eclosão e normalidade de larvas foram avaliados os efeitos dos diferentes crioprotetores dos três machos com o esperma fresco, aos quais

foram submetidos à análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) ao nível de 5% de significância. Em caso de efeito dos tratamentos, foi aplicada análise de comparação de médias de Tukey ao mesmo nível.

3. Resultados

As médias dos parâmetros espermáticos avaliados para o sêmen fresco dos três machos utilizados no estudo, não diferiu ($P>0,05$) entre eles (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros espermáticos e seminal fresco (média $\pm$ desvio padrão) de *P. mesopotamicus*.

Parâmetros espermáticos	Macho			p-valor
	1	2	3	
MOT (%)	95,40 $\pm$ 1,50	97,24 $\pm$ 0,82	93,64 $\pm$ 2,32	F=3,54; $P>0,05$
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	196,09 $\pm$ 12,86	199,11 $\pm$ 2,17	221,04 $\pm$ 6,26	F=5,52; $P>0,05$
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	140,90 $\pm$ 8,61	151,31 $\pm$ 2,49	140,20 $\pm$ 5,64	F=2,78; $P>0,05$
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	116,73 $\pm$ 5,45 ^{ab}	123,26 $\pm$ 2,48 ^a	108,24 $\pm$ 4,44 ^b	F=7,41; $P<0,05$
STR (%)	82,91 $\pm$ 2,19 ^a	81,46 $\pm$ 0,52 ^a	77,20 $\pm$ 0,06 ^b	F=9,96; $P<0,05$
PROG (μm)	1400,88 $\pm$ 88,03	1404,33 $\pm$ 83,93	1251,39 $\pm$ 96,01	F=2,21; $P>0,05$
Volume de sêmen (mL)	2,5	2,5	2,0	

Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

MOT: Motilidade; VCL: Velocidade curvilinear; VAP: Velocidade média da trajetória; VSL: Velocidade em linha reta; STR: Retilinearidade; PROG: Progressão

Para os dados relacionados à morfologia dos espermatozoides, verificou-se efeito ($P<0,05$) sob os tratamentos com espermatozoides criopreservados contendo os crioprotetores internos propilenoglicol e metilglicol, no qual apresentaram médias superiores ($P<0,05$) de alterações morfológicas comparadas ao espermatozoide fresco (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos parâmetros de morfologia espermática (média $\pm$ desvio padrão) referentes aos tratamentos contendo propilenoglicol e metilglicol como crioprotetores internos na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*.

Tratamentos	Normais	Anormalidades			
		Cauda dobrada	Cauda quebrada	Cauda corrugada	Gota citoplasmática
	Média $\pm$ desvio padrão	Média $\pm$ desvio padrão	Média $\pm$ desvio padrão	Média $\pm$ desvio padrão	Média $\pm$ desvio padrão
T3	15,44 $\pm$ 4,67 ^b	26,56 $\pm$ 3,57 ^b	39,33 $\pm$ 5,48 ^b	12,89 $\pm$ 5,09 ^d	5,78 $\pm$ 1,92 ^b
T7	13,44 $\pm$ 2,88 ^b	21,33 $\pm$ 2,60 ^c	39,89 $\pm$ 7,70 ^b	20,00 $\pm$ 4,09 ^{bc}	5,33 $\pm$ 1,66 ^b
T8	12,89 $\pm$ 3,30 ^b	19,11 $\pm$ 2,42 ^c	42,33 $\pm$ 6,76 ^b	20,89 $\pm$ 4,31 ^{bc}	4,78 $\pm$ 0,97 ^b
T9	11,67 $\pm$ 3,24 ^b	22,33 $\pm$ 3,35 ^c	42,89 $\pm$ 6,45 ^b	18,00 $\pm$ 4,06 ^c	5,11 $\pm$ 0,93 ^b
T10	13,44 $\pm$ 3,47 ^b	22,00 $\pm$ 3,00 ^c	39,44 $\pm$ 5,59 ^b	19,22 $\pm$ 4,99 ^{bc}	5,89 $\pm$ 1,54 ^b
T11	14,22 $\pm$ 3,63 ^b	22,33 $\pm$ 3,64 ^c	40,00 $\pm$ 8,00 ^b	18,67 $\pm$ 4,00 ^c	4,78 $\pm$ 1,72 ^b
T12	12,56 $\pm$ 4,13 ^b	21,00 $\pm$ 2,00 ^c	40,44 $\pm$ 4,85 ^b	20,00 $\pm$ 4,09 ^{bc}	6,00 $\pm$ 1,94 ^b
T13	14,00 $\pm$ 2,50 ^b	21,44 $\pm$ 3,57 ^c	38,89 $\pm$ 4,54 ^b	21,11 $\pm$ 3,79 ^{bc}	4,56 $\pm$ 1,42 ^b
T14	13,44 $\pm$ 2,55 ^b	21,44 $\pm$ 2,51 ^c	40,56 $\pm$ 3,88 ^b	18,67 $\pm$ 4,53 ^c	5,89 $\pm$ 1,54 ^b
T15	12,89 $\pm$ 2,42 ^b	21,67 $\pm$ 2,45 ^c	37,22 $\pm$ 4,84 ^b	22,22 $\pm$ 3,53 ^{bc}	6,00 $\pm$ 2,00 ^b
T16	12,67 $\pm$ 2,87 ^b	21,44 $\pm$ 2,88 ^c	41,22 $\pm$ 4,12 ^b	18,89 $\pm$ 3,22 ^c	5,78 $\pm$ 1,99 ^b
T17	15,11 $\pm$ 4,34 ^b	20,67 $\pm$ 3,32 ^c	38,22 $\pm$ 38,22 ^b	20,56 $\pm$ 3,81 ^{bc}	5,44 $\pm$ 2,01 ^b
T18	12,11 $\pm$ 4,01 ^b	20,22 $\pm$ 1,92 ^c	39,89 $\pm$ 3,89 ^b	23,44 $\pm$ 2,55 ^b	4,33 $\pm$ 1,22 ^b
Fresco	58,00 $\pm$ 2,11 ^a	11,94 $\pm$ 2,54 ^a	20,22 $\pm$ 3,00 ^a	7,39 $\pm$ 2,76 ^a	2,44 $\pm$ 0,85 ^a
p-valor	F(13,112)=112,92; p<0,01	F(13,112)=10,14; p<0,01	F(13,112)=8,54; p<0,01	F(13,33)=9,39; p<0,01	F(13,112)=3,26; p<0,01

Letras diferentes nas colunas indicam diferença (P<0,05) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

Foi observada diferença ($P < 0,05$) ao avaliar as taxas de alterações morfológicas espermáticas entre os diferentes tratamentos e o controle. Para os espermatozoides classificados como normais, verificou-se que todos os tratamentos diferenciaram negativamente ($P < 0,05$) do esperma fresco (Figura 1A). Em relação às alterações morfológicas classificadas como cauda corrugada, foi observada diferença ($P < 0,05$) do T1 e T4 em relação ao esperma fresco (Figura 1B). Para as alterações morfológicas classificadas como cauda dobrada e cauda quebrada foi observada diferença ($P < 0,05$) de todos os tratamentos em relação ao esperma fresco, sendo T4 inferior ($P < 0,05$) aos demais (Figuras 1C e 1D). Para as alterações morfológicas classificadas como gota citoplasmática o T1 apresentou-se inferior ($P < 0,05$) aos demais (Figura 1E).

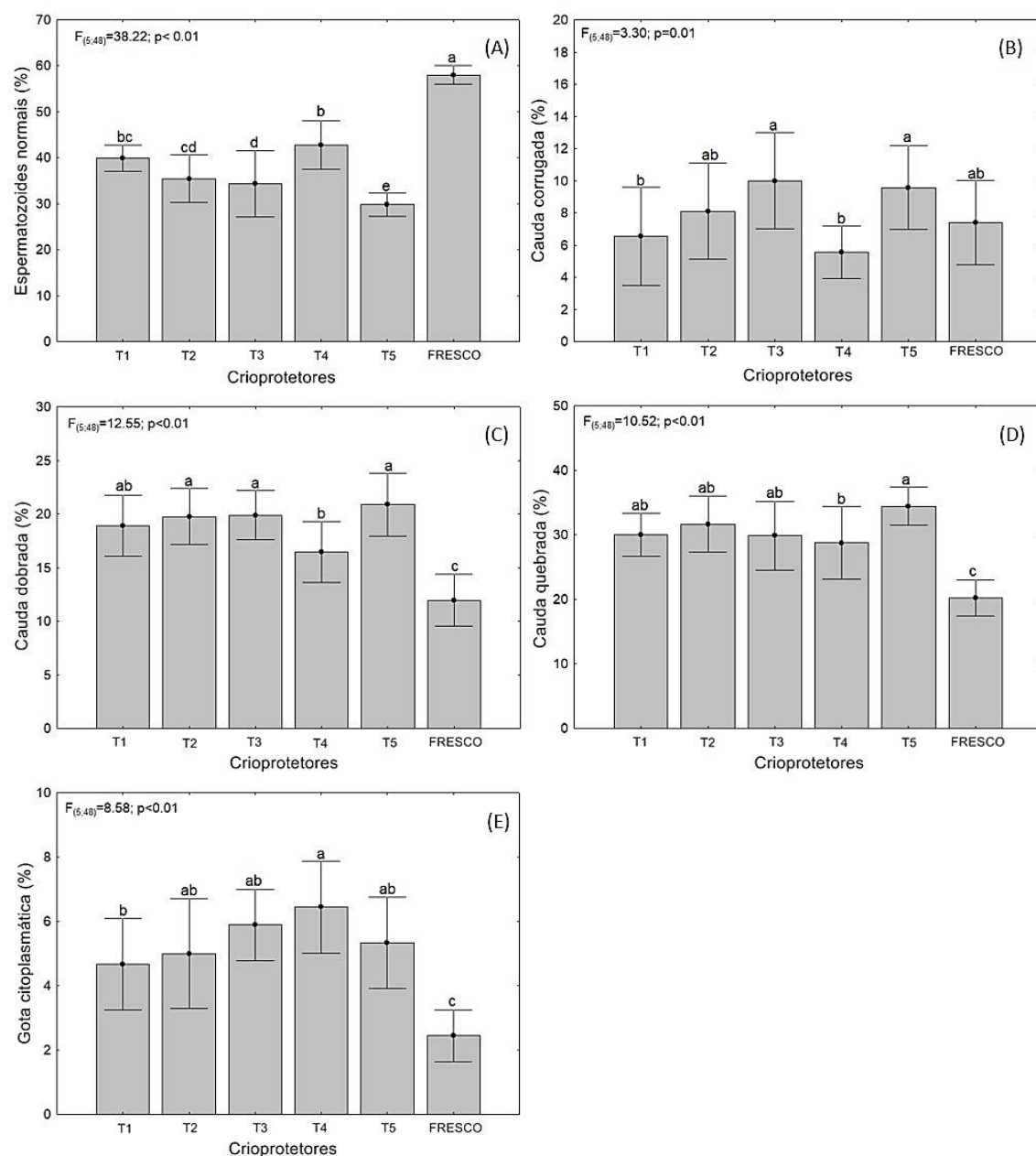


Figura 1. Taxas de alterações morfológicas espermáticas obtidas dos tratamentos com espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores em comparação ao espermatozoides frescos. (A): Espermatozoides normais; (B): Cauda corrugada; (C): Cauda dobrada; (D): Cauda quebrada; (E): Gota citoplasmática. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para os dados relacionados ao danos de DNA, as variáveis mostram que não foi verificado efeito ($P>0,05$) dos crioprotetores sobre a integridade da célula espermática (Figura 2).

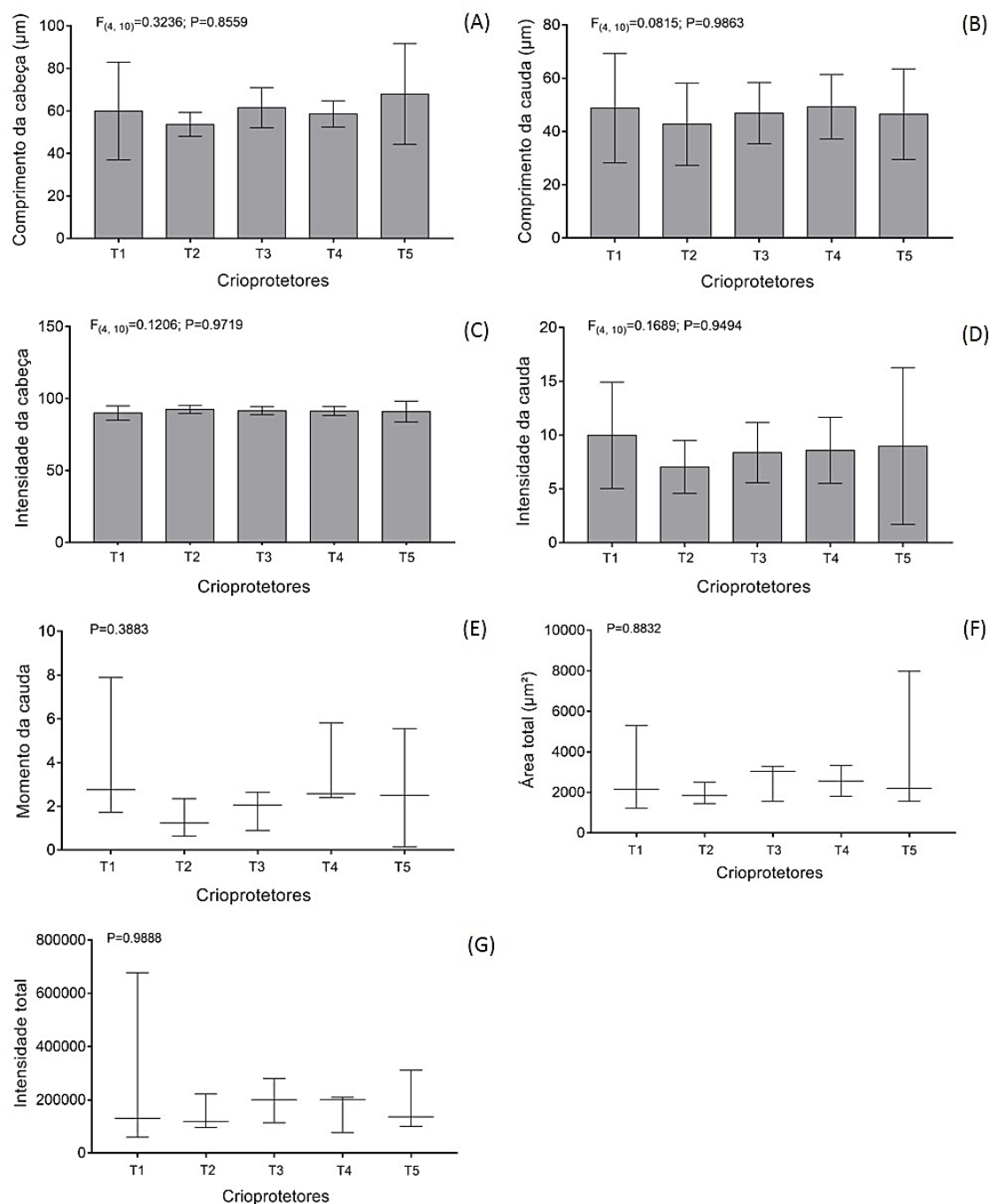


Figura 2. Variáveis obtidas para danos de DNA do espermatozoide criopreservado de *P. mesopotamicus* por meio do Ensaio Cometa Alcalino. A) Comprimento da cabeça (μm); B) Comprimento da cauda do cometa (μm); C) Intensidade da cabeça; D) Intensidade da cauda; (E) Momento da cauda; (F) Área total (μm²); (G) Intensidade total. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Verificou-se efeito negativo ($P<0,05$) sob os parâmetros espermáticos cinéticos quando analisadas amostras em soluções contendo os crioprotetores internos

propilenoglicol e metilglicol, no qual apresentaram-se inferiores ($P < 0,05$) ao esperma fresco, com exceção da Retilinearidade (STR) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos parâmetros espermáticos (média $\pm$ desvio padrão) referentes aos tratamentos contendo propilenoglicol e metilglicol como crioprotetores internos na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*.

Tratamentos	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	STR (%)	PROG (μm)
T3	1,38 $\pm$ 1,36 ^c	93,15 $\pm$ 56,49 ^{bdc}	23,95 $\pm$ 5,02 ^b	17,90 $\pm$ 2,14 ^b	77,39 $\pm$ 25,17 ^{ab}	278,22 $\pm$ 29,87 ^b
T7	4,77 $\pm$ 0,49 ^{bc}	69,92 $\pm$ 53,85 ^{cd}	22,16 $\pm$ 2,75 ^b	18,19 $\pm$ 5,35 ^b	81,9 $\pm$ 20,36 ^{ab}	256,80 $\pm$ 69,25 ^{bc}
T8	7,49 $\pm$ 6,49 ^b	89,35 $\pm$ 34,28 ^{bdc}	21,34 $\pm$ 4,72 ^b	18,16 $\pm$ 4,54 ^b	84,86 $\pm$ 4,59 ^{ab}	209,26 $\pm$ 74,16 ^{bcd}
T9	0,20 $\pm$ 0,35 ^c	149,17 ^{ab}	12,61 ^b	3,88 ^c	30,75 ^c	79,65 ^{cd}
T10	1,37 $\pm$ 2,37 ^c	101,85 ^{bcd}	19,95 ^b	15,28 ^{bc}	76,61 ^{ab}	180,64 ^{bcd}
T11	3,51 $\pm$ 1,34 ^{bc}	92,88 $\pm$ 26,24 ^{bcd}	18,94 $\pm$ 0,90 ^b	15,24 $\pm$ 1,80 ^{bc}	80,32 $\pm$ 5,83 ^{ab}	187,92 $\pm$ 48,07 ^{bcd}
T12	4,46 $\pm$ 4,25 ^{bc}	31,02 ^d	19,01 $\pm$ 4,26 ^b	12,74 $\pm$ 10,70 ^{bc}	92,19 ^a	117,74 $\pm$ 136,12 ^{bcd}
T13	2,46 $\pm$ 1,28 ^{bc}	103,86 $\pm$ 36,81 ^{bcd}	16,47 $\pm$ 0,12 ^b	9,86 $\pm$ 0,58 ^{bc}	59,84 $\pm$ 3,10 ^b	152,29 $\pm$ 31,69 ^{bcd}
T14	2,94 $\pm$ 3,90 ^{bc}	115,26 $\pm$ 44,65 ^{bc}	20,10 $\pm$ 2,77 ^b	13,54 $\pm$ 0,66 ^{bc}	68,25 $\pm$ 12,72 ^b	171,21 $\pm$ 14,80 ^{bcd}
T15	1,10 $\pm$ 1,31 ^c	141,26 $\pm$ 6,84 ^{abc}	15,40 $\pm$ 1,24 ^b	5,27 $\pm$ 2,56 ^{bc}	33,68 $\pm$ 13,91 ^c	43,54 $\pm$ 22,24 ^d
T16	2,00 $\pm$ 2,47 ^c	99,30 $\pm$ 35,10 ^{bcd}	20,40 $\pm$ 0,01 ^b	12,56 $\pm$ 2,61 ^{bc}	61,64 $\pm$ 12,83 ^{ab}	151,9 $\pm$ 48,92 ^{bcd}
T17	3,17 $\pm$ 2,12 ^{bc}	93,67 $\pm$ 36,41 ^{bcd}	17,16 $\pm$ 3,97 ^b	12,09 $\pm$ 4,30 ^{bc}	68,95 $\pm$ 11,93 ^{ab}	224,32 $\pm$ 70,38 ^{bcd}
T18	2,07 $\pm$ 0,46 ^c	106,22 $\pm$ 7,33 ^{bcd}	17,37 $\pm$ 4,31 ^b	13,01 $\pm$ 4,72 ^{bc}	73,84 $\pm$ 8,86 ^{ab}	148,65 $\pm$ 29,82 ^{bcd}
Fresco	95,24 $\pm$ 2,20 ^a	204,92 $\pm$ 13,09 ^a	143,7 $\pm$ 7,67 ^a	115,73 $\pm$ 7,82 ^a	80,52 $\pm$ 2,81 ^{ab}	1344,65 $\pm$ 113,12 ^a
p-valor	F(13,33)=666,61; p<0,01	F(13,23)=7,18; p<0,01	F(13,24)=310,89; p<0,01	F(13,24)=169,57; p<0,01	F(13,23)=5,22; p<0,01	F(13,24)=106,67; p<0,01

Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

MOT: Motilidade; VCL: Velocidade curvilínea; VAP: Velocidade média da trajetória; VSL: Velocidade em linha reta; STR: Retilinearidade; PROG: Progressão

Para os resultados avaliados, foi verificada diferença ($P < 0,05$) dos crioprotetores para a motilidade nos tratamentos referentes aos três machos, apresentando-se inferiores ao esperma fresco. Para o macho número 01, o T3 e T4 apresentaram-se superiores ($P < 0,05$) aos demais tratamentos compostos de crioprotetores (Figura 3A). Em relação ao macho número 02, o T4 obteve melhor ($P < 0,05$) resultado de motilidade (Figura 3B). Para o macho número 03, o T1 e T4 apresentaram-se iguais ($P > 0,05$), porém apresentaram-se muito inferiores em relação ao esperma fresco (Figura 3C). Ao avaliar o comportamento dos machos em cada solução crioprotetora, verificou-se efeito ($P < 0,05$) na motilidade dos três machos para cada solução. É possível observar que os machos números 01 e 02 apresentaram-se iguais nos tratamentos T2, T3 e T5. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) para o esperma fresco (Figura 3D).

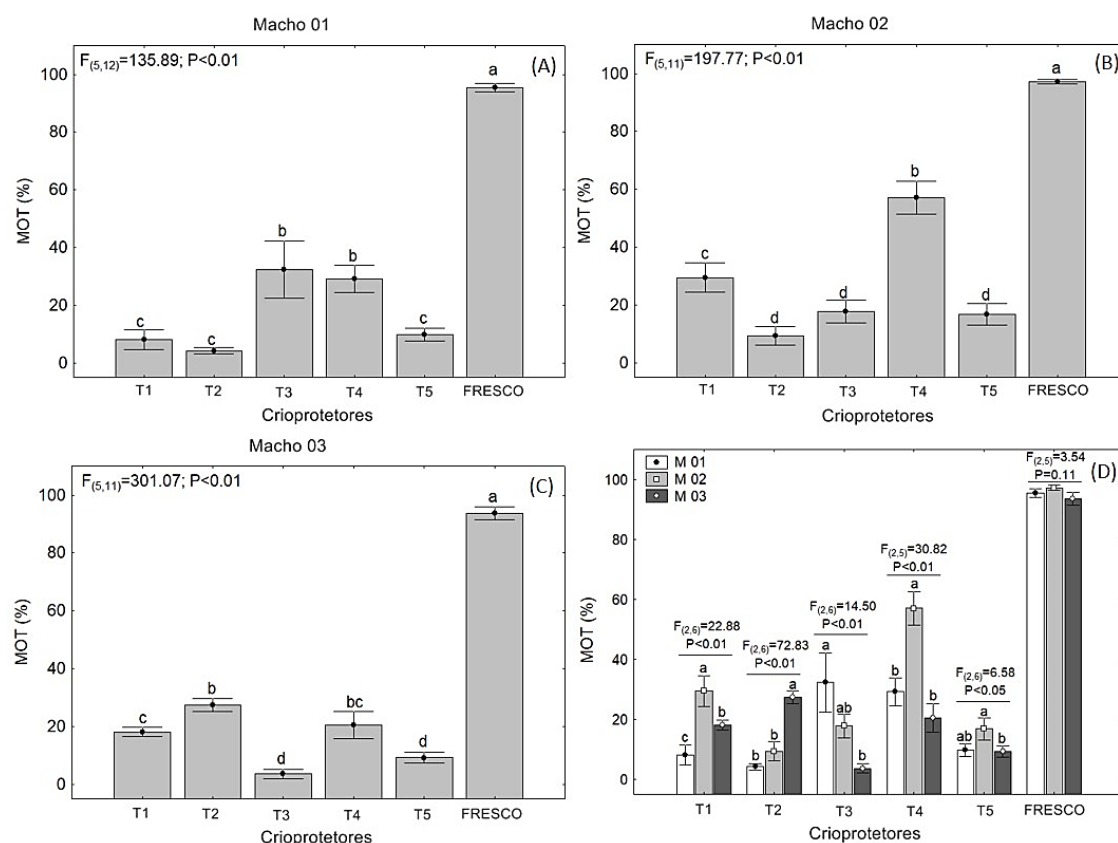


Figura 3. Taxas de motilidade obtidas por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para o parâmetro de velocidade curvilinear (VCL), observou-se diferença ($P<0,05$) dos crioprotetores nos tratamentos dos três machos. Os resultados obtidos para o macho número 01 foi o mais efetivo dentre os três machos, em que o melhor ($P<0,05$) resultado foi obtido com o T4, apresentando-se igual ao esperma fresco (Figura 4A). Para o macho número 02 (Figura 4B) e número 03 (Figura 4C), não foi verificado efeito ($P>0,05$) entre os tratamentos compostos por crioprotetores. Observou-se diferença ($P<0,05$) dos machos com T4 e para o esperma fresco (Figura 4D).

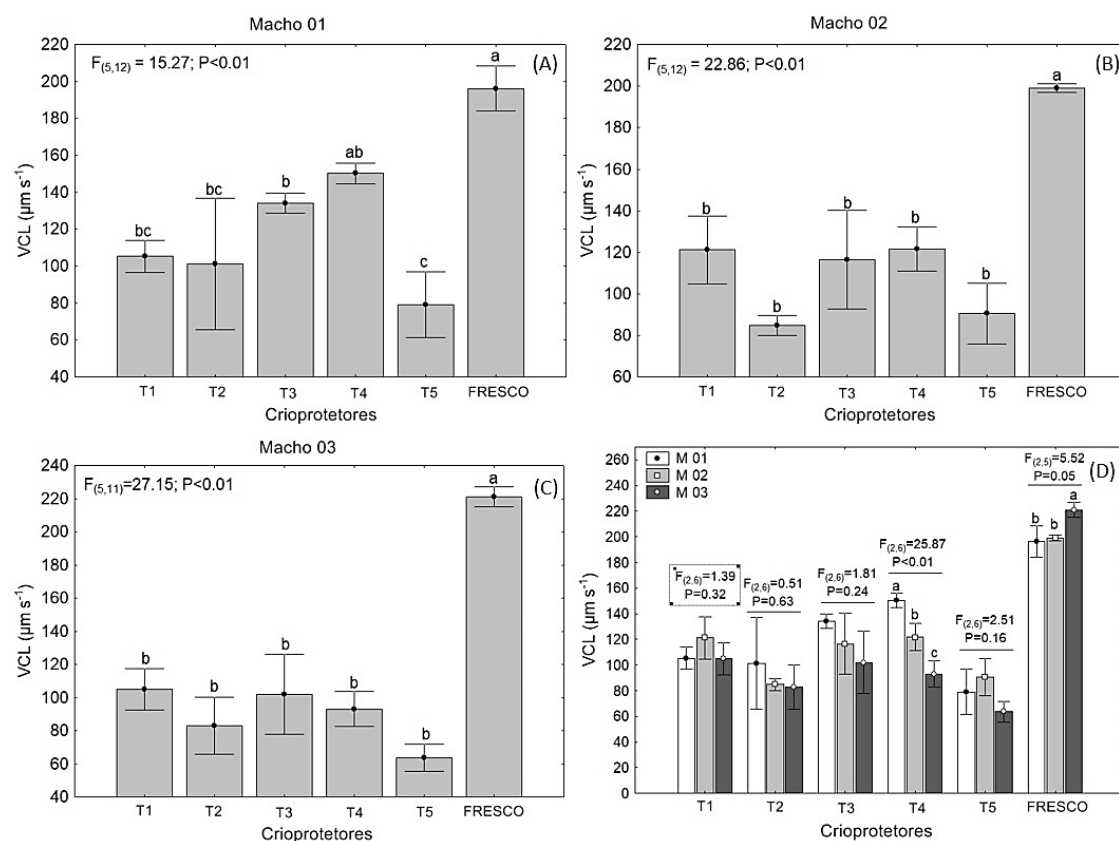


Figura 4. Velocidade curvilinear (VCL) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Dados obtidos para o parâmetro de velocidade média da trajetória do espermatozoide (VAP) demonstram efeito negativo ($P<0,05$) de todos os tratamentos com sêmen criopreservado em relação ao esperma fresco. Para o macho número 01, os tratamentos T3 e T4 demonstraram-se superiores aos demais (Figura 5A), enquanto para

o macho número 02, foram os tratamentos T1, T3 e T4 (Figura 5B). Para o macho número 03, não observou-se diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos com suas respectivas soluções crioprotetoras (Figura 5C). Não foi verificada diferença no uso dos machos sobre os tratamentos T1, T2 e esperma fresco (Figura 5D).

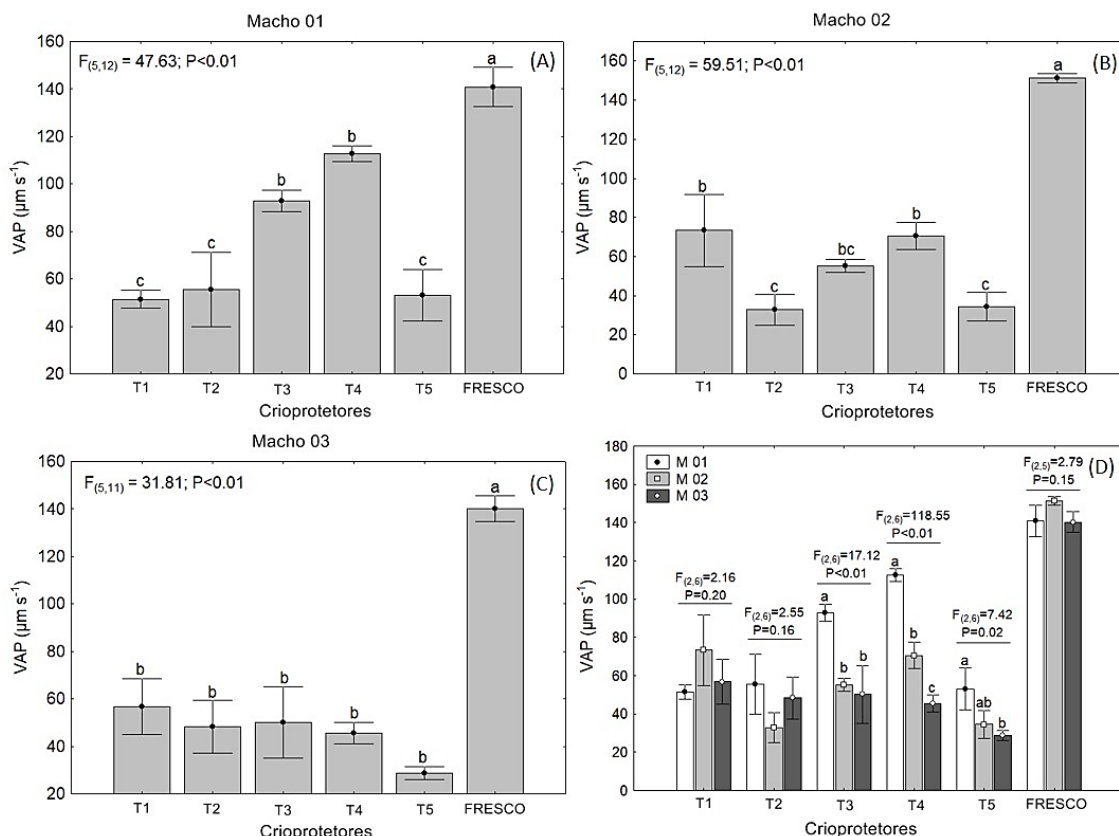


Figura 5. Velocidade média da trajetória do espermatozoide (VAP) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoide criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoide fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para o parâmetro espermático de Velocidade linear progressiva (VSL) foi verificada diferença ($P < 0,05$) das soluções crioprotetoras nos tratamentos dos três machos. Para o macho número 01, o T4 apresentou resultado semelhante ($P > 0,05$) ao espermatozoide fresco (Figura 6A). Em relação aos machos números 02 e 03, todos os tratamentos diferiram ($P < 0,05$) do espermatozoide fresco (Figura 6B e 6C). Não foi verificado efeito ($P > 0,05$) dos machos para T1, T2 e espermatozoide fresco (Figura 6D).

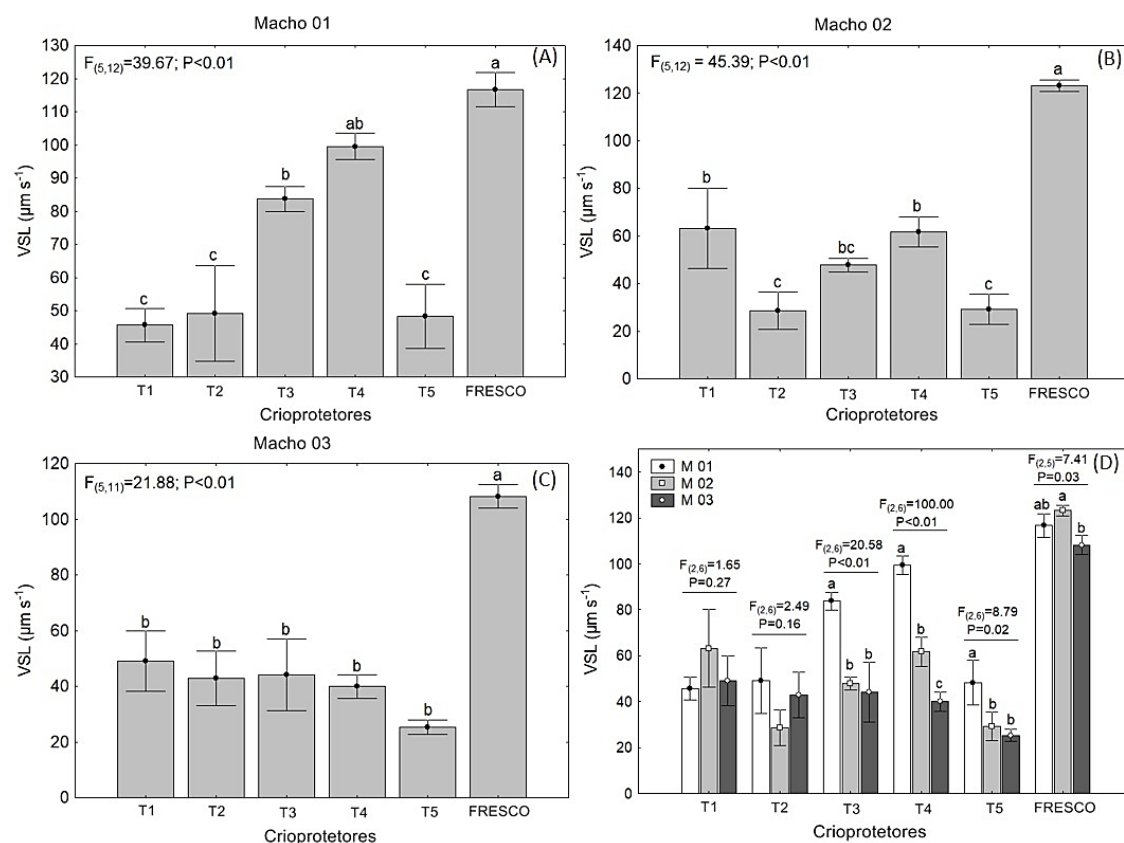


Figura 6. Velocidade linear progressiva (VSL) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoides fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para o parâmetro espermático de Retilinearidade (STR) do macho número 01, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre as soluções crioprotetoras, mas apresentaram-se superiores ($P < 0,05$) ao sêmen fresco (Figura 7A). O mesmo efeito ($P < 0,05$) pode ser observado para o macho número 02 (Figura 7B) e macho número 03 (Figura 7C). Foi verificada diferença no uso dos diferentes machos ($P < 0,05$) de T2 e espermatozoides fresco (Figura 7D).

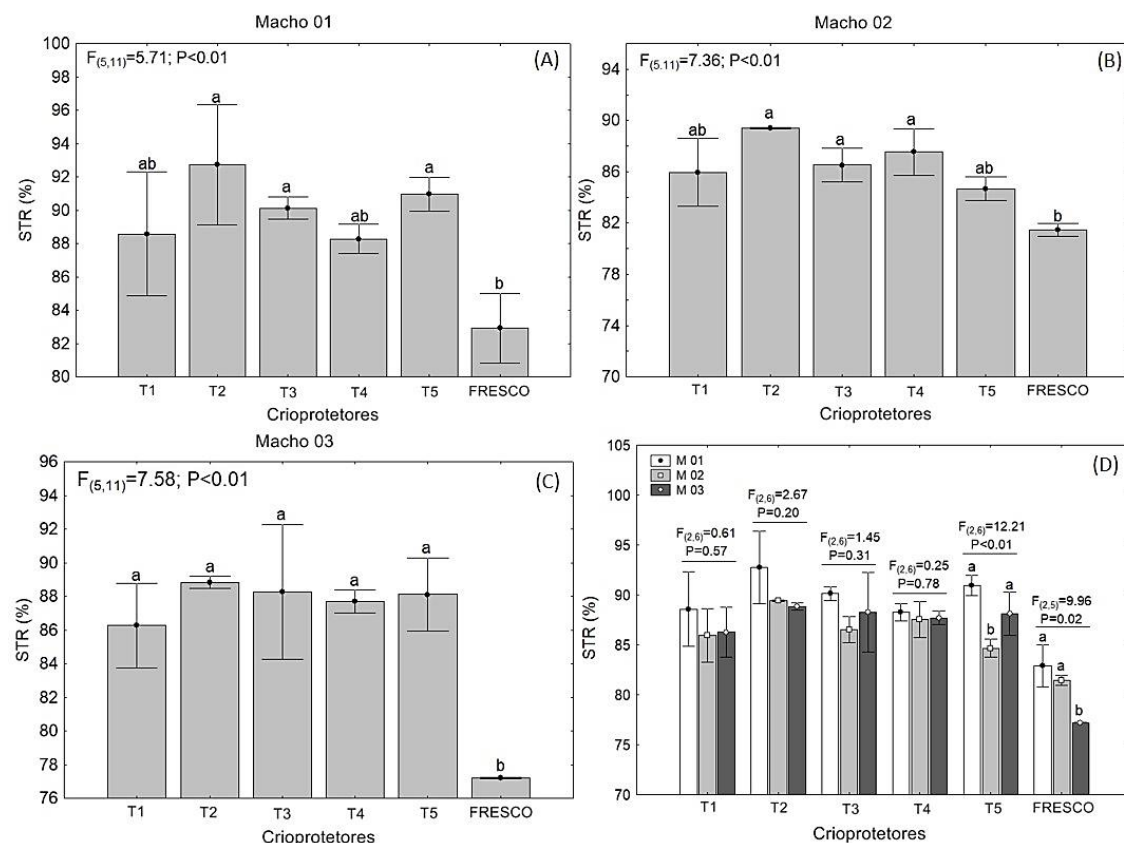


Figura 7. Retilinearidade (STR) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozóide fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para o parâmetro espermático de Progressão (PROG) do macho número 01, o T4 apresentou-se igual ($P<0,05$) ao sêmen fresco (Figura 8A). Para o macho número 02, os tratamentos diferiram ($P<0,05$) do espermatozóide fresco (Figura 8B). Para o macho número 03, não foi verificado efeito positivo ($P>0,05$) entre os tratamentos do espermatozóide contendo suas respectivas soluções crioprotetoras e apresentaram-se inferiores ($P<0,05$) ao espermatozóide fresco (Figura 8C). Não foi verificado efeito negativo ($P>0,05$) do uso dos machos nos tratamentos T1 e T2 e espermatozóide fresco (Figura 8D).

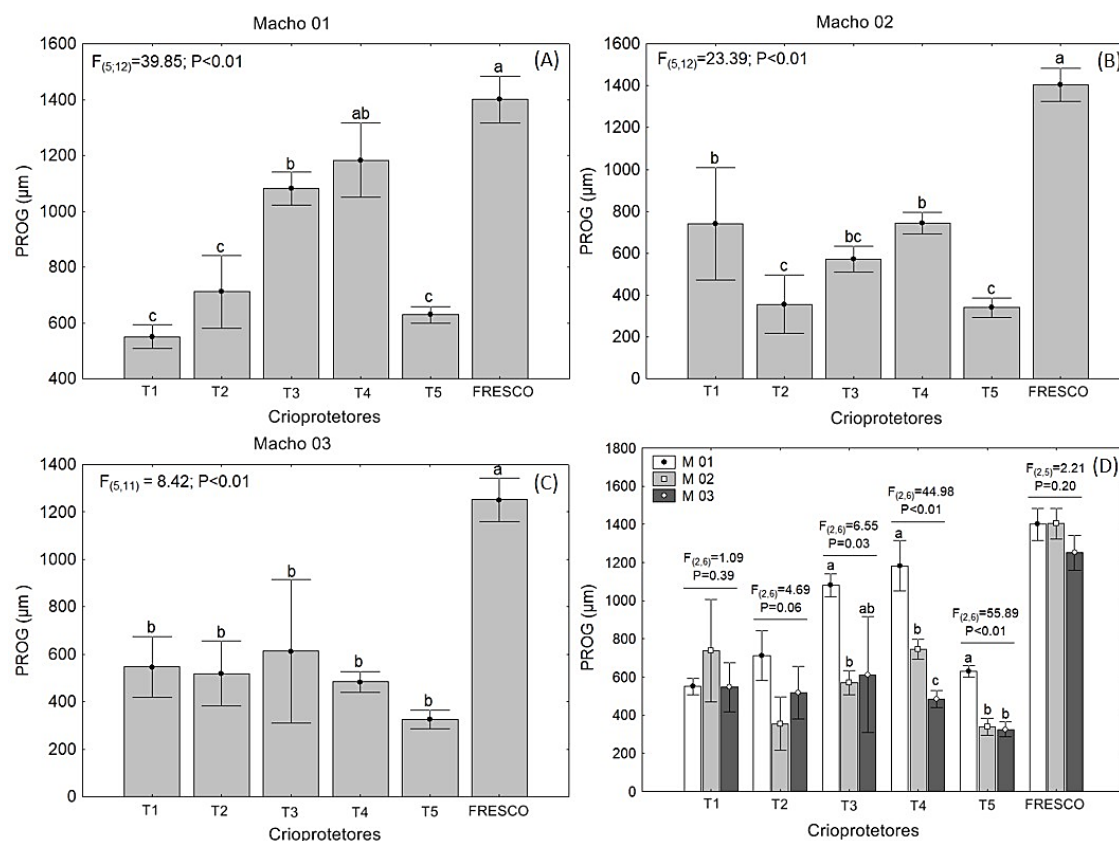


Figura 8. Progressão (PROG) obtida por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoides fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03; (D): efeito dos machos para cada solução. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

O presente experimento demonstrou a ocorrência de diferentes comportamentos e variabilidade nos resultados de taxas de fertilização, eclosão e normalidade das larvas entre os machos utilizados, em que o macho 3 demonstrou-se inferior ($P < 0,05$) aos demais, tanto para fertilização quanto para eclosão. Já para o percentual de larvas normais não foi verificado efeito ($P > 0,05$) dos crioprotetores e dos machos utilizados no procedimento de criopreservação (Tabela 5).

Tabela 5. Taxas de fertilização, eclosão e larvas normais (média $\pm$ desvio padrão) obtidas da fertilização artificial de espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* por meio de três diferentes machos utilizados.

Machos	n	Fertilização (%)	Eclosão (%)	Larvas normais (%)
1	15	38,82 $\pm$ 18,35 ^a	25,75 $\pm$ 13,19 ^a	80,63 $\pm$ 10,26
2	15	36,50 $\pm$ 28,36 ^a	25,23 $\pm$ 20,89 ^a	74,57 $\pm$ 15,70
3	15	13,95 $\pm$ 12,90 ^b	6,36 $\pm$ 7,60 ^b	68,48 $\pm$ 17,94
F_(2,38) e p-valor		11,14; <0,01	13,36; <0,01	2,33; 0,11

Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey.

Ao avaliar separadamente o efeito dos crioprotetores sobre as taxas de fertilização, eclosão e larvas normais para cada macho, verificou-se diferença ($P < 0,05$) em todos os parâmetros e diferente comportamento entre eles. Para as taxas de fertilização avaliadas do macho número 01, o T4 apresentou resultados iguais ($P > 0,05$) ao espermatozoides fresco (Figura 9A). Para o macho número 02, os tratamentos T1, T2 e T4 apresentaram melhores resultados, equivalentes ($P > 0,05$) ao espermatozoides fresco (Figura 9B). Para o macho número 03, todos os tratamentos diferenciaram ($P < 0,05$) do espermatozoides fresco (Figura 9C).

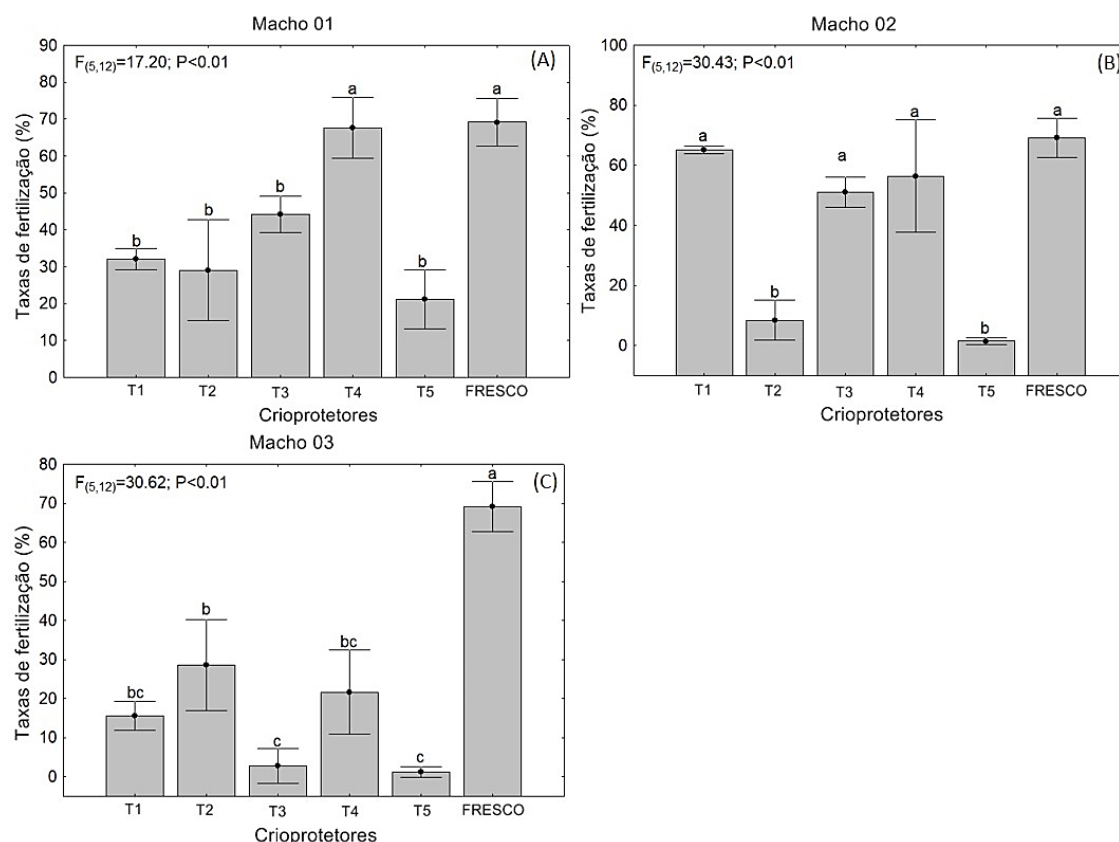


Figura 9. Taxas de fertilização obtidas de espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao espermatozoides fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03. Letras diferentes nas barras indicam diferença

significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para as taxas de eclosão, observou-se que o comportamento do esperma criopreservado com os respectivos crioprotetores dos machos número 01 e macho número 02 ocorreu em conformidade com a fertilização. Para o macho número 01, observou-se que o T4 apresentou-se similar ao sêmen fresco (Figura 10A). Para o macho número 02, o esperma criopreservado com T1, T3 e T4 apresentaram-se iguais ($P > 0,05$) ao esperma fresco (Figura 10B). Já para o macho número 03, verificou-se que todos os tratamentos apresentaram-se inferiores ($P < 0,05$) ao esperma fresco (Figura 10C).

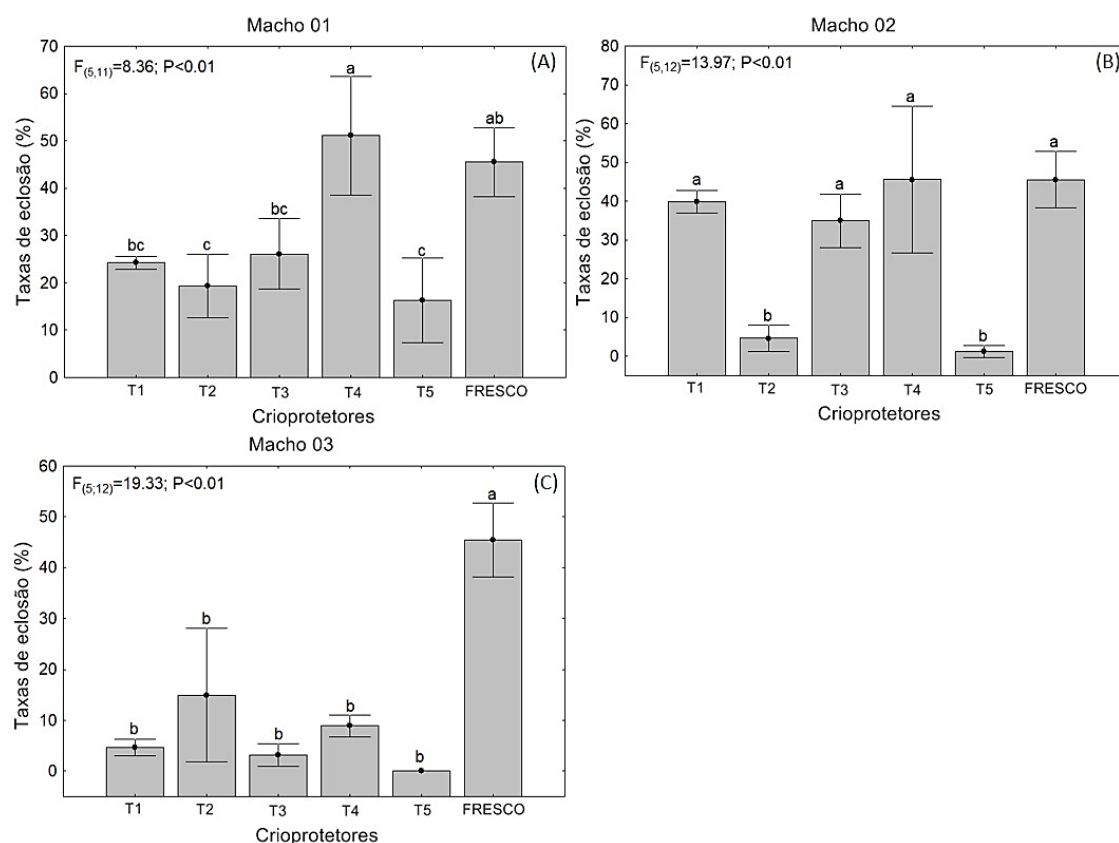


Figura 10. Taxas de eclosão obtidas de esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

Para os resultados de larvas normais obtidos para os machos números 01 e 02 verificou-se que a maioria dos tratamentos apresentaram-se superiores ($P < 0,05$) ao esperma fresco, exceto para os tratamentos T5 e T2, que apresentou-se igual ($P > 0,05$) e inferior ($P < 0,05$) ao esperma fresco, respectivamente (Figura 11A e 11B). Para o macho número 03, não foi verificado efeito ($P > 0,05$) para os resultados de larvas normais. (Figura 11C).

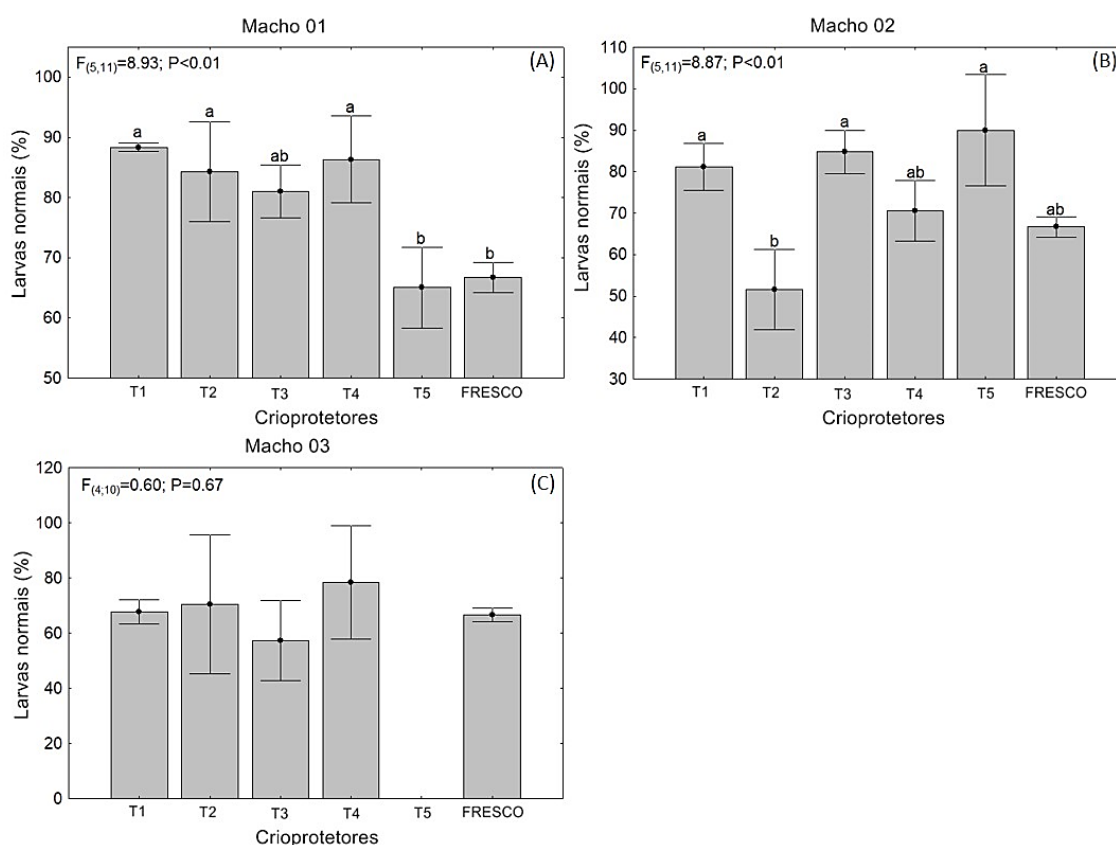


Figura 11. Taxas de larvas normais obtidas de esperma criopreservado de *P. mesopotamicus* com diferentes crioprotetores dos três machos em comparação ao esperma fresco. (A): Macho 01; (B): Macho 02; (C) Macho 03. Letras diferentes nas barras indicam diferença ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey. Crioprotetores: T1: 10% de metanol + 5% de glicose; T2: 10% de metanol + 7,5% de glicose; T3: 10% de metanol + 7,5% de sacarose; T4: 10% de metanol + 5% de frutose e T5: 10% de metanol + 7,5% de frutose.

4. Discussão

Os parâmetros espermáticos obtidos na análise do sêmen fresco no presente estudo, asseguraram confiabilidade para a experimentação dos diferentes protocolos de criopreservação propostos. Os parâmetros cinéticos avaliados, as médias foram: motilidade, acima de 90%; VCL, $205,38 \mu\text{m s}^{-1}$; VAP, $144,14 \mu\text{m s}^{-1}$ e $348,23 \mu\text{m s}^{-1}$ para a VSL. Teodozia et al. (2020) em estudo com a mesma espécie obtiveram melhores

resultados de cinética espermática ao utilizar 5% de glicose como diluente (motilidade: $40,52 \pm 7,1\%$; VCL: $28,53 \pm 4,07 \mu\text{m s}^{-1}$; VSL: $9,38 \pm 3,54 \mu\text{m s}^{-1}$ e VAP: $15,24 \pm 4,23 \mu\text{m s}^{-1}$). Streit Jr et al. (2009) ao analisarem o efeito do congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus* perceberam uma diminuição na motilidade progressiva (%) do espermatozoide *in natura* e pós-congelamento, de $69,09 \pm 7,4$ para $3,18 \pm 15,04$. Carvalho et al. (2014) afirmam que a adição de cafeína na solução ativadora composta por bicarbonato de sódio (NaHCO_3) pode melhorar os parâmetros de motilidade espermática de *P. mesopotamicus* dependendo da concentração utilizada. Quanto a concentração espermática, foi observado em média de $34,1 \times 10^9$ espermatozoides/mL de sêmen para o sêmen fresco, valor este, superior ao estimado por Maria et al. (2004) de $13,89 \pm 1,26 \times 10^9$ espermatozoides/mL para a mesma espécie. Cabe ressaltar que acordo com Salisbury e Vandemark (1964) o número de células reprodutivas fecundante (espermatozoides) é fundamental na rotina da reprodução artificial.

Durante o descongelamento das células espermáticas de *P. mesopotamicus* o resultado dos tratamentos que foram usados os crioprotetores propilenoglicol e metilglicol, não produziram taxas de motilidade espermática minimamente satisfatória ($\bar{x} = 2,2 \pm 1,9\%$) para serem usados nos testes de produtividade (taxas de fertilização, eclosão e larvas normais). O metilglicol é um álcool relativamente não tóxico de acordo com Takagi et al. (1993) e utilizado como crioprotetor seminal de peixes em diferentes espécies: *Brycon orbignyanus* (MARIA et al., 2006); *Brycon nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007) e *Prochilodus brevis* (NUNES et al., 2019). Por outro lado, o propilenoglicol já foi utilizado como crioprotetor para as espécies *Colossoma macropomum* (MENEZES et al., 2008); e *Leporinus macrocephalus* (RIBEIRO e GODINHO, 2003) mas não mostram eficiência para a criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*. Os efeitos negativos do metilglicol e do propilenoglicol pode ser explicado pelo fato de ambos possuírem um peso molecular (g/mol) maior comparado ao metanol, 90,12, 76,09 e 32,04, respectivamente. Por sua vez, o baixo peso molecular do metanol, resulta em alta solubilidade em soluções aquosas, tornando-o menos tóxico para a célula (NASH, 1996) e que segundo Cabrita et al. (2009), possibilita sua entrada nas células para proteção de suas organelas, especialmente a membrana plasmática.

Em geral, os crioprotetores com capacidade de penetração mais rápida, como o metanol, são mais favoráveis porque encurtam o tempo de exposição do crioprotetor antes do resfriamento evitando danos osmóticos (KASAI et al. 1996). Uma outra propriedade físico-química importante deste crioprotetor, é relacionada ao efeito positivo do metanol

que também pode estar ligado à sua afinidade pela água intracelular, que detém as moléculas de água em seu interior de acordo com Hubálek (2003). O autor completa ainda que este princípio impede que ocorra a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, a solidificação do meio se estabelece com uma distribuição molecular desordenada da água, onde a substância assume o caráter de uma substância vítrea protetora.

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), o que explica as baixas taxas de fertilização observadas nos tratamentos contendo propilenoglicol e metilglicol como crioprotetores internos do presente experimento, visto que estes tratamentos apresentaram altas taxas tanto para patologias primárias ou graves (caudas quebrada e corrugada) quanto para patologias secundárias ou leves (cauda dobrada e gota citoplasmática), de acordo com Streit Jr et al., (2009), bem como baixas taxas de motilidade. Já para os tratamentos utilizados para o processo de fertilização, também foram observadas patologias primárias e secundárias, no entanto, as taxas de motilidade observadas foram superiores aos demais tratamentos. Miliorini et al. (2011) ao estudarem o efeito do sêmen congelado de *Prochilodus lineatus* utilizando DMSO como crioprotetor, observaram cerca de 28% do total de anormalidades no sêmen congelado com taxa de fertilização de 37%. Galo et al., (2019) em estudos com sêmen descongelado de *P. mesopotamicus* utilizando o mesmo crioprotetor, observaram um percentual de anormalidades de 96,4% com fertilização igual a 59%. Não há na literatura informações de porcentagem máxima de anormalidades espermáticas determinadas para peixe para a utilização do sêmen no processo de fertilização, no entanto, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal recomenda não utilizar sêmen para fertilização com índices de espermatozoides com anormalidade acima de 30% em bovinos e equinos, e 20% em ovinos e suínos.

Dentre as variáveis avaliadas pelo programa Comet Assay, optou-se por utilizar os parâmetros mais recomendados para esta análise e utilizados em pesquisa (KUMARAVEL et al. 2009; GLEI et al. 2016), sendo Tail Length (comprimento da cauda do cometa, ou seja, a distância máxima que o DNA danificado migra do centro do núcleo da célula até a ponta da cauda) e Tail Moment (produto do comprimento da cauda e a porcentagem de DNA da cauda, o que fornece uma medida mais integrada do dano geral ao DNA na célula) (KONCA et al. 2003; TRIVEDI et al. 2010). No presente estudo, não foi observada diferença nos danos de DNA causados em espermatozoides criopreservados de *P. mesopotamicus* para o comprimento da cauda. O mesmo comportamento foi

observado por Rodrigues et al. (2021), onde ao analisarem os danos de DNA em espermatozoides criopreservados de *Danio rerio* não encontraram efeito das soluções crioprotetoras após a criopreservação para o comprimento da cauda do cometa. Portanto, é difícil afirmar a influência dos danos de DNA na fertilização, visto que, não há na literatura, informações sobre a porcentagem definida das variáveis estudadas que possam considerar a viabilidade do espermatozoide de *P. mesopotamicus*.

Os parâmetros espermáticos avaliados no presente experimento baseou-se nas definições fornecidas por Verstegen et al. (2002). Os parâmetros obtidos de velocidade curvilinear (VCL) e em linha reta (VSL), além da Progressão (PROG) avaliados no presente estudo, foram influenciados pelos machos utilizados. Para tanto, foi demonstrada a eficiência do esperma contendo MET 10% + FRU 5,0%, no qual obteve o mesmo resultado do esperma fresco. Estes parâmetros estão relacionados diretamente com a capacidade fertilizante do sêmen (VIVEIROS et al. 2010), o que pode-se afirmar por meio desses resultados, não haver influência negativa destes crioprotetores sobre da velocidade média da trajetória real, velocidade média medida em linha reta e a distância média percorridas pelo espermatozoide. No entanto, a velocidade média da trajetória do espermatozoide (VAP) foi influenciada pela ação dos crioprotetores no processo de criopreservação espermática, visto que, todos os tratamentos se mantiveram inferiores ao esperma fresco, porém, dentre os demais tratamentos, o esperma contendo MET 10% + FRU 5,0% destacou-se positivamente dos demais. É possível que o fato dos espermatozoides terem sido congelados tenham acarretado em menores taxas de velocidades. Este resultado pode ser comprovado por Carvalho et al. (2011) que em estudo com a espécie surubim-do-Paraíba *Steindachneridion parahybae* observaram que a velocidade dos espermatozoides desta espécie foi influenciada conforme o crioprotetor utilizado no processo de criopreservação. Ao avaliar o comportamento espermático criopreservado de surubim-do-Iguaçu *Steindachneridion melanodermatum*, Bombardelli et al. (2011) observaram variações de VCL e VSL em função de diferentes crioprotetores testados para a espécie, o que ocasionou a redução destas velocidades quando comparadas ao sêmen fresco. Isso reforça o comportamento eficaz do esperma contendo MET 10% + FRU 5,0% na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*. Além disso, Sanches et al. (2013) ressaltou que os espermatozoides de *Steindachneridion parahybae* apresentaram grande variação de VAP e VSL entre os machos em relação aos demais parâmetros de motilidade. Estes autores reforçam que o número de machos utilizados é importante e deve ser considerado em experimentos, visto que, há grande variabilidade

no comportamento resultante entre os indivíduos, o que consequentemente, ocasionam a variação nos parâmetros espermáticos.

A Retilinearidade (STR) obtida para o espermatozoide de *P.mesopotamicus* indicou um comportamento retilíneo quando referentes ao esperma fresco. No entanto, os tratamentos criopreservados mostraram-se superiores ao obtidos pelo esperma fresco, o que indica que a relação entre a velocidade em linha reta e a velocidade média da trajetória do espermatozoide que estimam a proximidade da trajetória da célula em linha reta pode ter sido influenciada pela ação dos crioprotetores de ambos os machos, o que provavelmente influenciou os movimentos do espermatozoide. Sanches et.al (2016) sugere que espermatozoides que apresentam movimentos circulares apresentam maior capacidade de fertilização. Tused et al. (2008), verificaram para Truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* correlação positiva entre os valores das taxas de fertilização com a VCL e correlação negativa com a velocidade em linha reta (VSL). Os autores concluem que estes resultados indicam que os maiores valores de fertilização podem ser observados quanto menor a VSL, uma vez que a VSL é um indicativo de retilinearidade. Ainda não há na literatura informações sobre o parâmetro de retilinearidade dos espermatozoides de *P. mesopotamicus*.

A avaliação da motilidade do espermatozoide é um imprescindível para reprodução, pois permitirá determinar a qualidade do sêmen bem como sua capacidade de fertilização. No presente estudo, a média estimada da taxa de motilidade para o esperma fresco entre os três machos foi de $96,7 \pm 1,4\%$, inferior ao encontrado por Miliorini et al. (2002) de $99,16 \pm 0,83\%$ e superior ao comparados por Maria et al. (2004) e Streit Jr et al. (2006) em que as amostras seminais observadas nesses estudos apresentaram $95,00 \pm 3,16\%$ e uma média de 75% de motilidade para a mesma espécie, respectivamente.

Resultados mais eficientes de motilidade espermática para esperma criopreservado no presente estudo foram encontrados ao utilizar esperma contendo MET 10% + FRU 5,0% em ambos os machos, o que confere um importante resultado para criopreservação espermática da espécie. Conforme afirmam Cosson (2010) e Alavi et al. (2009) a utilização de água destilada para ativação espermática é um fator que promove a cessação precoce da motilidade. Isso ocorre porque o meio de baixa osmolalidade (0 mOsm kg^{-1}) da água destilada é extremamente prejudicial à membrana plasmática dos espermatozoides, que possui maior pressão osmótica intracitoplasmática, que pode impedir a propagação das ondas e promover o encurtamento do flagelo e da curvatura em

forma de alça. Para tanto, Neumann (2012) afirma que soluções ativadoras contendo açúcares podem promover maiores taxas de motilidade e velocidades espermáticas, visto que essas soluções potencializam a movimentação dos espermatozoides (ZARSKI et al., 2012). Além disso, essa diferença nas taxas de motilidade utilizando crioprotetores na criopreservação espermática pode ser definida por outros fatores que desencadeiam o início da motilidade espermática, e afetam a duração da motilidade espermática, tais como as diferenças nas características físico-químicas do meio de ativação e plasma seminal (MORISAWA, 2008), como pressão osmótica, pH, osmolalidade e temperatura (ALAVI e COSSON, 2005; 2006). Viveiros e Godinho (2009) acrescentam que há possibilidade da composição do plasma seminal afetar a sensibilidade dos espermatozoides frente a ação dos crioprotetores. Informação corroborada em trabalho de Purdy (2006), em que ao estudarem o efeito dos crioprotetores no plasma seminal de caprinos, afirmaram que uma proteína da glândula bulbouretral de cabra diminuiu a sobrevivência dos espermatozoides após serem resfriados ou congelados diluídos em meio à base de leite. Além dos fatores citados, Zilli et al. (2008) e Chen et al. (2010) afirmam que além da redução da função mitocondrial que causam perdas do estoque de ATP da célula, danos diretos ao axonema do flagelo e destruição de proteínas também são prováveis causas associadas à redução da motilidade causadas pela ação do congelamento e descongelamento celular.

As taxas de fertilização alcançadas neste trabalho foram mais eficientes ao utilizar esperma contendo MET 10% + FRU 5,0% para ambos os machos, tendo em vista que os machos números 01 e 02 apresentaram resultados iguais ao esperma fresco. Portanto, infere-se que as características seminais pós descongelamento influenciaram a taxa de fertilização, devido aos danos causados pelo congelamento e descongelamento e que estão diretamente associados aos crioprotetores utilizados. Carolsfeld et al. (2003) em estudo com a mesma espécie, obtiveram cerca de $52,8 \pm 15,5\%$ de taxa de fertilização do sêmen criopreservado com contendo 5% de glicose, 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de gema de ovo. Os mesmos autores obtiveram resultados eficazes na criopreservação espermática da espécie nativa *Pseudoplatystoma corruscans*, o que mostrou a eficiência do metanol ao utilizar uma solução crioprotetora contendo metanol 10% adicionado a leite e pó 15%. Já a frutose, mesmo sendo um crioprotetor de baixo peso molecular com capacidade de ultrapassar a membrana do espermatozoide (PURDY, 2006), onde o sucesso da sua motilidade pode ser considerada por sua capacidade de reduzir a formação de cristais de gelo na célula e por atuar como uma importante fonte

de energia para o espermatozoide, visto que, possui a capacidade de fornecer substrato energético para as células germinativas masculinas.

Dados obtidos de eclosão das larvas no presente experimento mostram que o esperma criopreservado com MET 10% + FRU 5,0% foram mais eficazes para a espécie, apresentando-se iguais aos resultados obtidos do esperma fresco, considerando os machos números 01 e 02, assim como para as taxas de fertilização. A partir disso, podemos afirmar que as deformidades das larvas desenvolvidas foi influenciada pela toxicidade dos crioprotetores nos óvulos durante a fertilização ou dano causado no espermatozoide pelo processo de congelação e descongelação. No entanto, ao verificar a normalidade das larvas eclodidas, os tratamentos com o esperma contendo seus respectivos crioprotetores dos machos números 01 e 02 apresentaram resultados superiores ao esperma fresco para larvas normais, resultados que demonstram não haver influência da toxicidade dos crioprotetores no seu desenvolvimento.

Há poucos estudos sobre a criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*. Para isso, há a necessidade de obtenção de mais informações relacionadas à esta técnica para a realização de um protocolo específico para espécie, com propósito de aplicação em escala comercial.

5. Conclusão

O protocolo de criopreservação espermática de *P. mesopotamicus* deve ser composto por solução contendo 10% de metanol + 5% de frutose, diluída em água destilada.

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. 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>.
- 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., RODINA, M., POLICAR, T., LINHART, O. 2009. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.153, p.430 – 437. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.001>.
- AMANN, R. P., PICKETT, B. W. 1987. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-174. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).
- AMANN, R, KATZ D. F. Reflections on CASA after 25 years. 2004. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x>.
- 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>.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.41, p.395-406, 1987.
- BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 22-31, 1992.
- BOMBARDELLI, R. A., MÖRSCHBACHER, E. F., GOMES, E., NEUMANN, G., MARCOS, R. M., TOLEDO, C. P. R., TESSARO, L., MERTENZ, F., SANCHES, E. 2011. Milt cryopreservations protocols to iguaçu surubim (*Steindachneridion melanoderdatum*). In: *World Aquaculture 2011*. World Aquaculture Society (WAS) (Ed.). WAS, Natal, Brazil, p.157.
- CABRITA, E., ENGROLA, S., CONCEIÇÃO, S., LACUISSE, M., POUSÃO-FERREIRA, P., DINIS, M. T. 2009. Preliminary attempts on the cryopreservation of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) sperm. **Aquaculture**, v.287, p.152–157.
- 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>.
- CARVALHO, I. C., ARAÚJO, R. V., CANEPPELE, D., VIVEIROS, A. T. M. 2011. Motilidade e velocidades espermáticas do sêmen criopreservado de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, avaliado através do Sistema Computadorizado (CASA). In: *III Conferência Latinoamericana Sobre Cultivo de Peixes Nativos e III Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos*. Universidade Federal de Lavras (UFLA) (Ed.). UFLA, Lavras, Brazil.
- 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>.

- CHEN, Y. K., LIU, Q. H., JUN LI, J., XIAO, Z. Z., XU, S. H., SHI, X. H., MA, D. Y. 2010. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. **Cryobiology**, v.61, p.189-193. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.07.003>.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 49, 1998.
- COSSON, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v.76, p.240-279. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02504.x>.
- ENCISO, M.; SARASA, J.; AGARWAL, A.; FERNÁNDEZ, J.L.; GOLSÁVEZ, J. 2009. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. **Reproductive BioMedicine OnLine**, v.18, p. 609-616. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60003-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60003-X).
- FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709-714, 2007. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60672-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60672-4).
- FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p.45-53, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>.
- FURUYA, W. M. **Espécies nativas**. In: Moreira, H. L. M.; Vargas, L., Ribeiro, R. P., Zimmermann, S. (Ed.). Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: ULBRA. pp. 83-90. 2001.
- 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>.
- GLEI, M., SCHNEIDER, T., SCHLÖRMANN, W. 2016. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**. v.90, p.2315–2336. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y>.
- GLOGOWSKI, J.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. 1999. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. **North American Journal of Aquaculture**, v.61, p.258-262. <https://doi.org/10.1811/37298>.
- GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, London, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.001>.
- 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).
- 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>.

- KASAI, M., ZHU, S. E., PEDRO, P. B., NAKAMURA, K., EDASHIGE, K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v.33, p.459–464. <https://doi.org/10.1006/cryo.1996.0046>.
- KOŃCA, K., LANKOFF, A., BANASIK, A., LISOWSKA, H., KUSZEWSKI, T., GÓZDŹ, S., KOZA, Z., WOJCIK, A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.534, p.15–20. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00251-6).
- KUMARAVEL, T. S., VILHAR, B., FAUX, S. P., JHA, A. N. 2009. Comet Assay measurements: A perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, p.53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R. A. 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta* f. *fario* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp. **Aquaculture Research**, v.26, p.801-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00873.x>.
- MARIA, A. N., MURGAS, L. D. S., SILVA, M. O. B., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T., LOGATO, P. V. R. 2004. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.1, 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>.
- MARIA, A. N., AZEVEDO, H. C., CARNEIRO, P. C. F. **Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura**. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1 ed. Amapá: Embrapa Amapá, v. 1, p. 47-63. 2009.
- 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>.
- MENEZES, J. T. B., QUEIROZ, L. J., DORIA, C. R. C., MENEZES JR, J. B. 2008. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazônica**, v.38, n.2, p.365-368. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000200023>.
- MILIORINI, A. B., MURGAS, L. D. S., VIVEIROS, A. T. M., FRANCISCATTO, R. T., SILVA, M. O. B., MARIA, A. N. 2002. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.209-211.

- 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>.
- MYLONAS, C. C., GISSIS, A., MAGNUS, Y., ZOHAR, Y. 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. **Aquaculture**, v. 153, p. 301-311. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00021-5).
- NASH, T. 1996. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, p.179-220.
- NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., TOLEDO, C. P. R., SANCHES, E. A. **Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre**. 1ª ed. Toledo: LATRAAC/UNIOESTE, 86p. 2013.
- NEUMANN, G. 2012. Frutose como ativador e crioprotetor espermático do Surubim do Iguaçu, (*Steindachneridion melanodermatum*). Monografia Curso de Engenharia de Pesca Universidade Estadual do Oeste do Paraná 2012. 38p.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- NUNES, L. T., OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S., LOPES, T. J., ALMEIDA-MONTEIRO, P. S., NASCIMENTO, R. V., PEREIRA, V. A., FERREIRA, Y. M., MONTENEGRO, A. R., PINHEIRO, J. U., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. 2019. Capacidade fecundante do sêmen congelado de *Prochilodus brevis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.92791>
- 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>.
- PAULINO, M. S., MURGAS, L. D. S., FELIZARDO, V. O., FREITAS, R. T. F. 2012. Anormalidades espermáticas de *Piaractus mesopotamicus* após descongelamento utilizando diferentes metodologias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1591-1596. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600027>.
- 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>.
- RIBEIRO, R. I. M. A., GODINHO, H. P. 2003. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piauí *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 75-79. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000100011>.

- ROBLES, V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HÉRRÆEZ, M. P. 2003. Vitrication of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Maryland Heights, v.47, n.1, p.30-39. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00066-X).
- RODRIGUES, R. B., UCZAY, M., BRITO, V. B., GODOY, A. C., MOURA, D. C., VOGEL, C., VASCONCELOS, A. C. N., STREIT JR, D. P. 2021. Oxidative Stress and DNA Damage of Zebrafish Sperm at Different Stages of the Cryopreservation Process. **Zebrafish**, v.18, p.97-109. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1942>.
- ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrication, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrication. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 3, p. 508-516. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.008>.
- SALISBURY, G. W., VANDEMARK, N. L. **Fisiologia de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos**. Zaragoza: Acribia, p. 707, 1964.
- 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., 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., 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>.
- SANCHES, E. A., CANEPPELE, D., OKAWARA, R. Y., DAMASCENO, D. Z., BOMBARDELLI, R. A., ROMAGOSA, E. 2016. Inseminating dose and water volume applied to the artificial fertilization of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae): Brazilian endangered fish.

- Neotropical Ichthyology**, v. 14, n.01. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140158>.
- 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. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.7, p. 157-162.
- 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. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/409>.
- 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.
- TAKAGI, M., BOEDIONO, A., SAHA, S., SUZUKI, T. 1993. Survival rate of frozen - thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. **Cryobiology**, v.30, p.306-312. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1029>.
- 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>.
- TRIVEDI, P. P., KUSHWAHA, S., TRIPATHI, D. N., JENA, G. B. 2010. Evaluation of male germ cell toxicity in rats: Correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.703, p.115–121. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.005>.
- TUSET, V. M., DIETRICH, G. J., WOJTCZAK, M., SLOWIŃSKA, M., De MONSERRAT, CIERESZKO, A. 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.393-397. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01145.x>.
- 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. **Criopreservação de sêmen de peixes**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, GO. Palestras..., 2005.
- VIVEIROS, A. T.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.293-300. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.025>.
- VIVEIROS, A. T. M., GODINHO, H. P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.137-150. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>.
- VIVEIROS, A. T. M., NASCIMENTO, A. F., ORFÃO, L. H., IZAÚ, 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>.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1).
- 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>.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, n.4, p. 871- 891. 1995.
- 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>.
- ZARSKI, D., HORVÁTH, A., KOTRIK, L., TARGONSKA, K., PALINSKA, K., KREJSZEFF, S., BOKOR, Z., URBÁNYI, B., KUCHARCZYK, D. 2012. Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs J. **Journal of Applied Ichthyology**, v.28, p. 967-972. <https://doi.org/10.1111/jai.12098>.
- ZILLI, L., SCHIAVONE, R., STORELLI, C., VILELLA, S. 2008. Molecular Mechanisms Determining Sperm Motility Initiation in Two Sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). **Biology of Reproduction**, v.79, p.356–366. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068296>.

CAPÍTULO III – Artigo

É possível produzir larvas de *Piaractus mesopotamicus* em escala comercial utilizando sêmen criopreservado em tubos criogênicos?*

RESUMO

A criopreservação é uma técnica de grande interesse para piscicultura que pode ser utilizada rotineiramente em laboratórios de reprodução. No entanto, alguns gargalos na reprodução ainda são visíveis, onde estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após a aplicação desta técnica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da solução crioprotetora composta por 10% de metanol e 5,0% de frutose, ativadas em frutose (2,5%) no processo de criopreservação espermática em tubos criogênicos e produção de larvas de *P. mesopotamicus*. Para a reprodução artificial, foram utilizadas uma fêmea e doze machos. Para o congelamento do sêmen foi utilizado três pools de sêmen obtidos de três machos cada e diluídos em solução crioprotetora composta por 10% de metanol, 5,0% de frutose diluídos em água destilada na proporção de 1:9 (sêmen:diluidor). Após a diluição o sêmen foi envazado em tubos criogênicos de 2,0mL e então submetidos ao pré-congelamento em vapor de Nitrogênio líquido (*Dry-shipper*) por duas horas antes de serem transferidos ao nitrogênio líquido (5 dias). Para a fertilização, os ovos foram distribuídos em doze incubadoras cônicas (60 litros) utilizando-se sêmen criopreservado e um tratamento formado por um pool de sêmen fresco obtido de três machos não congelados (controle). Verificou-se que a frutose a 2,5% potencializa a qualidade espermática de sêmen criopreservado em comparação à água destilada. Para as taxas de fertilização, observou-se que não houve diferença ($P>0,05$) entre os espermatozoides criopreservados com 10% MET + 5,0% FRU dos pools números 1 e 2 e o espermatozoide fresco, porém com resultados inferiores ($P<0,05$) observado para o pool 3. O mesmo comportamento foi observado ao estimar o número de larvas normais de cada incubadora. O método de criopreservação utilizado no presente experimento atingiu níveis satisfatórios de produção de larvas de *P. mesopotamicus* em escala comercial.

Palavras-chave: Reprodução artificial, sêmen, congelamento, fertilização, larvas

*Artigo escrito sob as normas da Revista Aquaculture

1. Introdução

De acordo com a FAO (2020), a pesca extrativista e a aquicultura mundial proveram aproximadamente 178,5 milhões de toneladas de pescado, sendo 156,4 mil toneladas para consumo humano em 2018, com a produção de peixes continentais representando 62,3% do total produzido pela aquicultura. No Brasil, segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura, a produção estimada da piscicultura no Brasil em 2021 foi de 841 mil toneladas, com um crescimento de 4,7% sobre a produção de 2020, sendo 31,2% representados por peixes nativos (Peixe BR, 2022).

Dentre as espécies nativas brasileiras, o *P. mesopotamicus* (Holmberg, 1877) (CHARACIFORMES:SERRASALMIDAE) é um peixe altamente utilizado na aquicultura e repovoamento de reservatórios hidrelétricos no Brasil. O interesse econômico pela espécie ocorreu devido ao seu alto valor comercial, 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).

Técnicas de grande interesse para piscicultura podem ser utilizadas a fim de auxiliar de forma prática a produção de espécies de interesse comercial e potencial econômico em escala comercial. A criopreservação é um exemplo de técnica que pode ser utilizada rotineiramente em laboratórios de reprodução, que possibilita o armazenamento do material genético em nitrogênio líquido a -196°C, conservando-se a estrutura, funcionalidade das células e tecidos vivos, tornando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inativos do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007).

Sua aplicação proporciona inúmeras vantagens, tais como, a eliminação do problema causado pela assincronia da maturidade gonadal entre machos e fêmeas; a praticidade do manejo dos reprodutores em que pode-se trabalhar com machos e fêmeas separadamente em momentos distintos; a facilidade de transporte do material genético entre as pisciculturas, o que evita o transporte de animais vivos e influencia positivamente nos custos da produção; o estabelecimento de programas de hibridização com peixes de diferentes períodos reprodutivos (VIVEIROS, 2005; MARIA et al., 2009) e a formação de bancos de germoplasma que permite a manutenção da diversidade genética e a reposição de espécies ameaçadas de extinção (VIVEIROS et al., 2009, MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2009).

Para obter sucesso na criopreservação, são utilizadas soluções crioprotetoras específicas que irão atuar como soluções substitutas da água presente no meio intracelular, por meio de gradiente osmótico, no qual irão realizar a desidratação parcial da célula, reduzindo o limiar de congelamento e evitando que cristais de gelo se formem nas camadas internas e externas da célula, protegendo-a dos danos causados pelas baixas temperaturas (ROSATO e IAFFALDANO, 2013; NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003). Sabe-se que estas soluções possuem função de proteção contra a exposição à baixas temperaturas em que as células são submetidas, no entanto, podem causar danos osmóticos e toxicidade (GUAN et al., 2010). Além disso, outro fator importante a ser considerado é a velocidade de redução da temperatura durante o congelamento, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (WATSON, 1995).

Os agentes crioprotetores são classificados como intracelulares (permeáveis) e extracelulares (não permeáveis). Os agentes crioprotetores intracelulares são classificados em dois grupos, alcoólicos e amidas (ASHWOOD-SMITH, 1987) e são representados por 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). O metanol utilizado no presente experimento como crioprotetor interno teve como função evitar a formação de cristais de gelo que comprometem a integridade da membrana espermática interna durante as mudanças de temperatura. Do ponto de vista físico-químico, os crioprotetores intracelulares são responsáveis por atuar através de suas propriedades coligativas, na redução do ponto crioscópico intracelular, na qual irá favorecer um ambiente menos deletério a célula espermática durante a congelação (WATSON, 1995). Os agentes crioprotetores extracelulares são representados por substâncias de alto peso molecular que não conseguem penetrar no interior da célula, portanto, irão atuar na proteção externa da célula (FAHY, 2010). São representados por açúcares complexos, no presente experimento pela frutose, que atuam por efeito osmótico estimulando a saída de água intracelular e por se caracterizarem como compostos hidrofílicos, estas substâncias irão se ligar às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução prevenindo a formação de cristais de gelo (FAHY, 2007; AMANN e PICKETT, 1987). Além disso, os crioprotetores extracelulares atuam na regulação da motilidade espermática, na osmolaridade do plasma seminal e possuem efeito direto na ativação espermática (BILLARD e COSSON, 1992).

No entanto, alguns protocolos dependem da padronização determinadas por diluentes e crioprotetores mais eficazes, com objetivo de manter a alta qualidade espermática. Devido a variação das características do sêmen entre as espécies, tais como morfologia e fisiologia, ocorre a necessidade do desenvolvimento de protocolos para a criopreservação de sêmen personalizados (LAHNSTEINER et al., 1995; GLOGOWSKI et al., 1999).

Neste contexto, com resultado baseado no protocolo do primeiro experimento realizado na presente dissertação, o objetivo deste trabalho foi produzir larvas em escala comercial de *P. mesopotamicus* a partir de sêmen criopreservado em tubos criogênicos de 2,0 mL utilizando-se como solução crioprotetora 10% de metanol e 5,0% de frutose, e frutose (2,5%) como solução ativadora.

2. Material e Métodos

Os reprodutores de *P. mesopotamicus* foram provenientes do plantel de reprodutores do setor de piscicultura da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Regional do Vale do Ribeira, Pariquera-Açú, São Paulo, Brasil e o experimento foi conduzido no laboratório de Aquicultura da Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira (FCAVR) de Registro/SP.

2.1 Seleção dos reprodutores

Para o experimento, foram utilizados quinze reprodutores de *P. mesopotamicus* com idade de cinco anos. Por meio de massagem no sentido encéfalo-caudal, selecionaram-se doze machos que liberaram esperma mediante a pressão abdominal e três fêmeas que apresentaram abdômen abaulado e papila genital avermelhada. No período anterior ao o experimento, os exemplares foram mantidos em viveiros escavados (900m³) em sistema intensivo, 5 a 10% de renovação diária de água, fotoperíodo natural, 0,13 kg m⁻³ de densidade de peixes e alimentação duas vezes por semana com 1% de biomassa de peixes com 28% de ração de proteína bruta (regime alimentar aplicado na rotina da piscicultura).

Os exemplares foram em seguida transportados para o laboratório, onde foram selecionados individualmente, pesados (machos, $\bar{X}=2839,2\pm497\text{g}$); (fêmeas, $\bar{X}=3260\pm361\text{g}$), identificados e posteriormente separados por sexo em caixas d'água circulares (0,5 m³, com 1,24m de diâmetro), com aeração constante por meio de bombas

de aeração. Com intuito de obter maior quantidade de sêmen e promover ovulação, os peixes foram submetidos ao procedimento de indução hormonal.

2.2 Indução hormonal

Para as fêmeas, foi utilizado o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) diluído em solução salina (NaCl 0,9% - 0,5 mL Kg⁻¹), com duas dosagens, a primeira de 0,5mg de EBHC Kg⁻¹ e a segunda de 5,0 mg de EBHC kg⁻¹, acompanhada de 0,5 mL/kg⁻¹ de prostaglandina sintética Ciosin® em um intervalo de doze horas (CRISCUOLO-URBINATI et al., 2012). Para os machos foi aplicada uma dosagem única de 2,5 mg EBHC kg⁻¹, trinta minutos antes da segunda dosagem das fêmeas (GALO et. al 2019). Após indução, parâmetros de qualidade da água foram mensurados: potencial hidrogeniônico (pH): 7,09±0,30; oxigênio dissolvido: 5,55±2,28 mg/L; amônia: 0,66 ppm e temperatura: 28,5 ± 0,49°C.

2.3 Coleta de dados

2.3.1 Machos

Os exemplares foram selecionados individualmente, contidos e secos com tecido de algodão e papel toalha para coleta dos gametas, que ocorreu através de massagem na região abdominal no sentido encéfalo-caudal após 232 horas-grau a 29°C. A primeira gota de sêmen coletada foi descartada com o intuito de evitar contaminação pela presença de urina. O restante do sêmen foi armazenado em tubo de ensaio graduado Falcon (±0,1 mL) e alocados em pequenos recipientes em caixas de isopor contendo gelo e conservados a temperatura de 15°C (SANCHES et al., 2015) por aproximadamente duas horas para posterior análises dos parâmetros espermáticos e processo de congelamento do sêmen.

Para a avaliação da qualidade espermática, foi realizada uma avaliação subjetiva prévia de motilidade do sêmen de cada macho. O material seminal de nove machos selecionados (acima de 90% de motilidade) foram utilizados por meio de um pool para o processo de congelamento de sêmen e avaliação de concentração e motilidade.

A concentração espermática foi estimada com base na contagem de células em câmara hematómica de Neubauer conforme Mylonas et al., (1997) e Sanches et al., (2011a) calculado conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) para sêmen de mamíferos.

A motilidade dos espermatozoides foi avaliada por método computadorizado com software de código aberto (WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2007) com o objetivo de

reduzir a subjetividade e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento das células (AMANN e KATZ, 2004). A partir de então, foi possível multiplicar a média dos valores das taxas de motilidade com a concentração espermática, tendo como produto a concentração de espermatozoides móveis por mL. Para isso, foi realizada uma análise prévia para testar o efeito de duas soluções ativadoras, água destilada e frutose (2,5%) na proporção 1:600 (sêmen:ativador), para serem posteriormente utilizadas na fertilização. Posterior ativação, os vídeos (100fps) foram gravados com auxílio de uma câmera Basler acA640-120gc (<http://www.baslerweb.com>), rapidamente levados a um microscópio de luz trinocular (SolaristBel) em objetiva 10x, conectado ao computador (CPU intel core i5 © 1,6 GHz, 8 GB de Ram) com sistema operacional Microsoft Windows 10 ©. As análises foram realizadas 5s pós-ativação (0,25s - 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), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e progressão (PROG). Para isso, as configurações utilizadas no programa foram: a=1, b=60, c=25, d=12, e=3, f=10, g=15, h=5, i=1, j=10, k=15, l=25, m=80, n=80, o=50, p=60, q=100, r=561.7978, s=0, t=0, u=0); adaptado para a espécie conforme sugerido por Neumann et al. (2013).

Para o congelamento das amostras, três pools de sêmen provenientes de nove machos foram congelados individualmente, adotando-se um intervalo de uma hora entre cada pool. Para isso, os pools foram diluídos em solução crioprotetora com 10% de metanol + 5,0% de frutose diluído em água destilada, na proporção de 1:9 (sêmen:solução crioprotetora). Em seguida, dentro de uma caixa de isopor resfriada a 15°C (gelo), o material foi envasado em tubos criogênicos (2,5 mL), com tempo de equilíbrio de quinze minutos, alocados em racks e imediatamente imerso em vapor de nitrogênio em um container criogênico do tipo *Dry shipper* (YDH-8-80/8 litros) a -170°C durante duas horas. Após, os tubos criogênicos foram transferidos para um container “tipo líquido” (XT20/40 litros) onde foram armazenados e congelados em nitrogênio líquido a -196°C por cinco dias.

Após o congelamento das amostras, os tubos criogênicos foram retirados e imersos imediatamente em banho-maria por 80 segundos à temperatura de 60°C para descongelamento, adaptado de Paulino et al. (2012). Para esse procedimento, as amostras foram retiradas e descongeladas separadamente, a fim de serem descongeladas uniformemente, para que não houvesse o risco de perda de motilidade. Para isso,

descongelou-se primeiramente as amostras criopreservadas provenientes do primeiro pool de sêmen para análise de motilidade espermática. O mesmo procedimento foi realizado para os segundo e terceiro pools de sêmen criopreservados.

2.3.2 Fêmeas

O procedimento empregado para a coleta dos oócitos foi por meio de extrusão manual (massagem abdominal) sentido cabeça cauda após 240 horas-grau da 2ª indução hormonal. Foi retirada de uma única fêmea, doze amostras de 40g de oócitos, correspondentes às quantidades de incubadoras, aos quais foram destinados ao processo de fertilização. Para isso, foram retiradas três amostras de 0,1g para estimativa da quantidade de oócitos por grama.

A fim de garantir uma máxima fertilidade e uma melhora significativa nas taxas de fertilização, aplicou-se a proporção padrão de espermatozoide por oócito (dose inseminante) conforme Sanches et al. (2011b), porém utilizando a motilidade espermática obtida com o CASA para estimar o número móveis de espermatozoides/oócito. Para isso, foi mensurada a concentração espermática de cada amostra de sêmen criopreservado onde os dados adquiridos foram calculados para estimar a proporção do sêmen fresco e criopreservado (sêmen:oócito:água) igual para cada amostra, as quais foram submetidas ao processo de fertilização receberam 100.000 espermatozoides móveis por oócito.

2.4 Delineamento experimental

Para o congelamento do sêmen foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos, sendo três pools provenientes de nove machos e um tratamento controle composto por sêmen fresco de três machos. A solução crioprotetora foi composta por metanol (Synth®) na concentração de 10% como crioprotetor intracelular e frutose (Synth®) na concentração de 5,0% como crioprotetor extracelular.

Para a fertilização, os oócitos foram distribuídos em doze incubadoras cônicas (60 litros) utilizando-se sêmen criopreservado e um tratamento formado por um pool de sêmen de três machos não congelados (controle). Foi considerada como uma unidade experimental uma incubadora cônica (60 litros) contendo 40 g de oócitos provenientes de uma única fêmea aos quais foram fertilizados com a respectiva dose inseminante estimada em 100.000 espermatozoides móveis por oócito e ativadas com 40 mL da solução de frutose (2,5%). As incubadoras mantiveram-se sob circulação constante de água, aos

quais garantiam a hidratação contínua dos ovos até o momento da eclosão das larvas em um sistema de recirculação de 1200 litros. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos (Tabela 1).

Oito horas após a fertilização (fechamento do blastóporo – 28°C) (Weber et al., 2012; Amorim et al., 2009), foram retiradas de cada incubadora três amostras (média: 260 ovos) com auxílio de uma peneira para estimativa das taxas de fertilização (TF). Os ovos foram alocados em câmaras de vidro e classificados os ovos em fertilizados (OF) (translúcidos e com desenvolvimento embrionário normal) e não fertilizados (NF) (opacos ou brancos), avaliados por meio da fórmula: $TF (\%) = 100 * (OF / (OF + NF))$.

A eclosão ocorreu aproximadamente 16 horas após a fertilização, em que foram retiradas três amostras de larvas (LA) de cada incubadora (média: 215 larvas) e contadas em estereomicroscópio binocular (objetiva de 10x) para classificação das mesmas em relação à sua morfologia, onde aquelas que não apresentaram nenhum tipo de alteração morfológica foram considerados normais (LN), e as que apresentaram alterações ou deformidades como alterações na nadadeira foram consideradas como larvas defeituosas (LD), avaliadas pela fórmula: $LN (\%) = 100 * (LN / (LN + LD))$.

Em seguida, o percentual de larvas normais foi multiplicado pelas taxas de fertilização e pelo número de ovos de cada incubadora para a estimativa do número de larvas normais por incubadora.

Tabela 1. Parâmetros medidos de qualidade da água (média ± desvio padrão) utilizada na fertilização e incubação dos ovos de *P. mesopotamicus*.

Parâmetros de qualidade da água	Valores
Condutividade Elétrica (mS/cm)	262,20 ± 81,47
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,55 ± 2,28
Potencial Hidrogeniônico (pH)	7,1 ± 0,30
Temperatura (°C)	28,45 ± 0,49
Amônia (ppm)	0,66

2.5. Análise estatística

Os dados obtidos de água destilada e frutose (2,5%) como soluções ativadoras foram submetidos à análise de t-student ao nível de 5% de significância.

Os dados obtidos de fertilização e da estimativa de larvas viáveis foram submetidos à análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*). Em caso de efeito dos

tratamentos, foi aplicado o teste de comparação de médias de Duncan a 5% de significância.

3. Resultados

A fêmea apresentou como fecundidades absoluta e relativa um total de 674.114 oócitos e 225 oócitos/g de fêmea, respectivamente, representando uma média de 1400 oócitos/g, com diâmetro medindo $1,14 \pm 0,11$ mm, parâmetros estes, dentro dos padrões observado para a espécie (GODINHO e GODINHO, 1986; ROMAGOSA et al., 1990). Os parâmetros espermáticos computadorizados mensurados para o processo de criopreservação do sêmen e fertilização nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Parâmetros espermáticos computadorizados (média $\pm$ desvio padrão) dos sêmens fresco (pré-congelamento) e criopreservado (pós-congelamento) de *P. mesopotamicus*.

Parâmetros espermáticos	<i>Sêmen Fresco</i>		
	Pool 1	Pool 2	Pool 3
MOT (%)	92,44 $\pm$ 4,04	95,82 $\pm$ 2,14	91,71 $\pm$ 6,46
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	184,82 $\pm$ 18,73	212,53 $\pm$ 25,19	220,66 $\pm$ 15,52
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	135,84 $\pm$ 19,50	160,85 $\pm$ 14,90	178,78 $\pm$ 18,87
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	116,50 $\pm$ 20,86	134,60 $\pm$ 10,71	153,10 $\pm$ 18,12
STR (%)	85,51 $\pm$ 4,03	83,77 $\pm$ 2,41	85,57 $\pm$ 1,45
PROG (μm)	1192,36 $\pm$ 286,58	1333,42 $\pm$ 43,18	1569,20 $\pm$ 132,82
Parâmetros espermáticos	<i>Sêmen Criopreservado</i>		
	Pool 1	Pool 2	Pool 3
MOT (%)	45,80 $\pm$ 6,12	39,21 $\pm$ 11,85	36,78 $\pm$ 5,73
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	147,21 $\pm$ 6,73	134,73 $\pm$ 34,58	123,72 $\pm$ 14,66
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	106,03 $\pm$ 11,79	100,70 $\pm$ 30,03	63,54 $\pm$ 12,11
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	90,95 $\pm$ 9,93	88,62 $\pm$ 25,62	55,68 $\pm$ 10,65
STR (%)	85,79 $\pm$ 0,70	88,22 $\pm$ 1,05	87,64 $\pm$ 1,36
PROG (μm)	1003,01 $\pm$ 143,85	1006,95 $\pm$ 297,63	612,11 $\pm$ 109,17

MOT: Motilidade; VCL: Velocidade curvilinear; VAP: Velocidade média da trajetória; VSL: Velocidade em linha reta; STR: Retilinearidade; PROG: Progressão

Tabela 3. Parâmetros espermáticos computadorizados (média $\pm$ desvio padrão) do pool de sêmen fresco proveniente de três machos utilizado no processo de fertilização de *P. mesopotamicus*.

Parâmetros espermáticos	Pool Fert <i>Fresco</i>
MOT (%)	97,13 $\pm$ 1,26
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	222,66 $\pm$ 19,45
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	122,12 $\pm$ 19,37
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	118,07 $\pm$ 15,87
STR (%)	81,94 $\pm$ 0,15
PROG (μm)	355,67 $\pm$ 48,94

MOT: Motilidade; VCL: Velocidade curvilinear; VAP: Velocidade média da trajetória; VSL: Velocidade em linha reta; STR: Retilinearidade; PROG: Progressão

Para os dados da água destilada e frutose (2,5%) utilizadas como soluções ativadoras do sêmen criopreservado, foram avaliados os efeitos destas soluções entre os pools números 01, 02 e 03 para parâmetros espermáticos de Motilidade (MOT), Velocidade curvilinear (VCL), Velocidade média da trajetória (VAP) e Velocidade em linha reta (VSL), onde foi evidenciado efeito significativo ($P < 0,05$) no comportamento dessas soluções ativadoras para o pool número 01 dentre todos os parâmetros espermáticos avaliados e para o pool número 03 para o parâmetro de motilidade (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros espermáticos computadorizados (média $\pm$ desvio padrão) de água destilada e frutose (2,5%) utilizadas como soluções ativadoras para o sêmen criopreservado de *P. mesopotamicus*, obtidos de três pools de sêmen provenientes de três machos.

Parâmetros espermáticos	Pool 1			Pool 2			Pool 3		
	Água Destilada	Frutose (2,5%)	T-test	Água Destilada	Frutose (2,5%)	T-test	Água Destilada	Frutose (2,5%)	T-test
MOT (%)	30,40 $\pm$ 6,97	45,80 $\pm$ 6,12	t-valor=-2,87; p=0,0452	29,23 $\pm$ 8,75	39,21 $\pm$ 11,85	t-valor= -1,17; p=0,3058	20,64 $\pm$ 6,34	36,78 $\pm$ 5,73	t-valor=-3,27; p=0,0308
VCL (μm/s)	107,06 $\pm$ 3,52	147,21 $\pm$ 6,73	t-valor=-9,16; p=0,0008	122,71 $\pm$ 12,14	134,73 $\pm$ 34,58	t-valor=-0,57; p=0,6004	103,09 $\pm$ 12,69	123,72 $\pm$ 14,66	t-valor=-1,84; p=0,1392
VAP (μm/s)	68,83 $\pm$ 1,89	106,04 $\pm$ 11,78	t-valor=-5,40, p=0,0057	68,04 $\pm$ 8,55	100,70 $\pm$ 30,03	t-valor=-1,81; p=0,1443	55,41 $\pm$ 13,04	63,54 $\pm$ 12,11	t-valor=-0,79; p=0,4727
VSL (μm/s)	60,31 $\pm$ 0,84	90,95 $\pm$ 9,93	t-valor=-5,32; p=0,0060	58,54 $\pm$ 6,15	88,62 $\pm$ 25,62	t-valor= -1,98; p=0,1191	48,16 $\pm$ 13,71	55,68 $\pm$ 10,64	t-valor=-0,75; p=0,4947

MOT: Motilidade; VCL: Velocidade curvilinear; VAP: Velocidade média da trajetória; VSL: Velocidade em linha reta

Ao avaliar o efeito da água destilada e frutose (2,5%) como soluções ativadoras nos três pools de sêmen criopreservados de *P. mesopotamicus* avaliados em conjunto, foi verificado efeito ($P < 0,05$) em todos os parâmetros de velocidade espermática avaliados, observando-se resultados mais eficientes para a frutose (2,5%) (Figura 1).

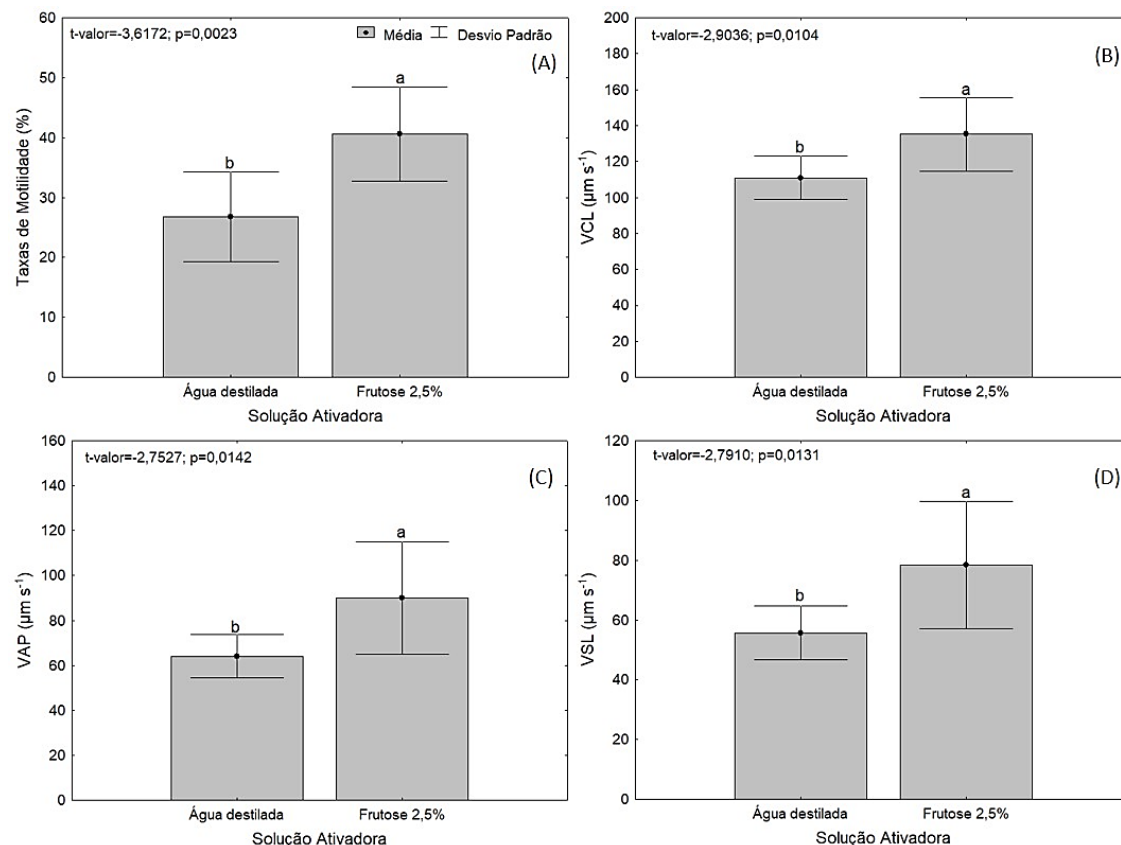


Figura 1. Parâmetros espermáticos computadorizados obtidos por meio do software livre ImageJ/plugin CASA para água destilada e frutose (2,5%) utilizadas como soluções ativadoras na ativação dos pools de sêmens criopreservados de *P. mesopotamicus*. (A): Motilidade; (B) Velocidade curvilínea (VCL); (C) Velocidade média da trajetória (VAP); (D) Velocidade em linha reta (VSL). Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias T-student.

Para os dados de taxas de fertilização e normalidade das larvas, foi realizada a média das amostragens e considerados os valores médios de cada incubadora. Foi observado efeito ($P < 0,05$) ao avaliar as taxas de fertilização e número total de larvas normais para cada pool de sêmen criopreservado utilizando MET 10% + FRU 5,0% como crioprotetores. Para as taxas de fertilização, observou-se que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os espermatozoides criopreservados com 10% MET + 5,0% FRU dos pools números 1 e 2 e o espermatozoides fresco (Figura 2). O mesmo comportamento foi observado ao estimar o número de larvas normais de cada incubadora (Figura 3). Para as taxas de larvas

normais, não evidenciou-se efeito ($P>0,05$) entre os pools empregados para a fertilização, obtendo média de $93,36\pm4,54\%$ de larvas normais.

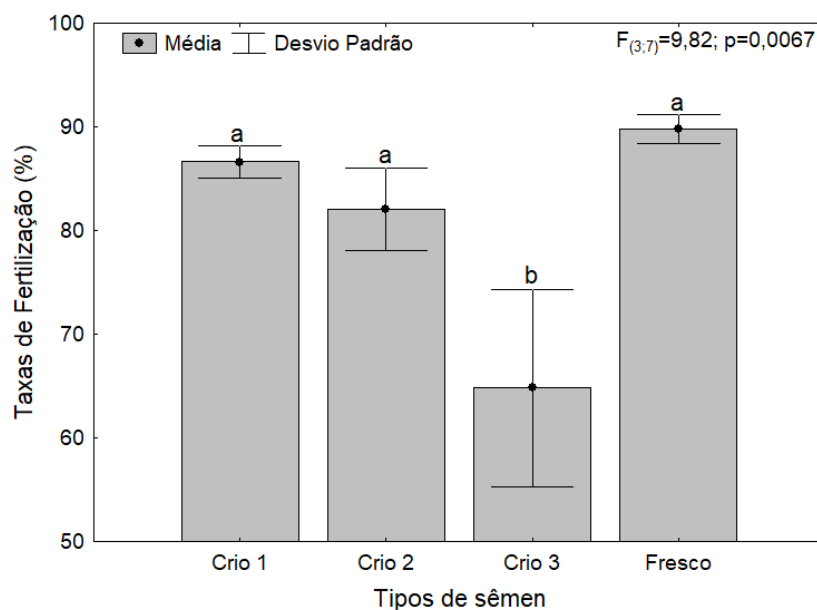


Figura 2. Taxas de fertilização obtidas dos três pools de sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservados utilizando MET 10% + FRU 5,0% como crioprotetores comparados ao esperma fresco. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Crio 1: Pool 1; Crio 2: Pool 2; Crio 3: Pool 3.

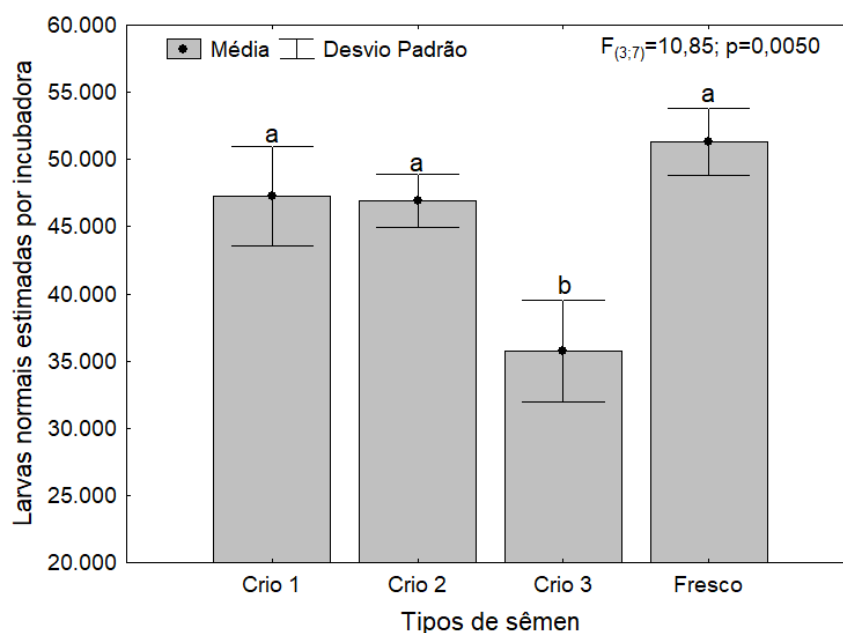


Figura 3. Número de larvas normais estimadas por incubadora obtidas dos três pools de sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservados utilizando MET 10% + FRU 5,0% como crioprotetores comparados ao esperma fresco. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Crio 1: Pool 1; Crio 2: Pool 2; Crio 3: Pool 3.

4. Discussão

O desenvolvimento de novos recipientes de armazenamento visa preservar as características do sêmen após o descongelamento e facilitar o uso do sêmen congelado em larga escala sem que seja necessário o uso de grande número de palhetas com pequeno volume, como é observado na maioria dos trabalhos realizados com criopreservação espermática (MARIA e CARNEIRO 2012). Assim, em nosso estudo provamos ser possível produzir larvas de *P. mesopotamicus* em escala comercial utilizando sêmen criopreservado em tubos criogênicos.

Os resultados de fertilização do espermatozoide criopreservado com MET 10% + FRU 5,0% mostraram-se iguais ao espermatozoide fresco apresentando-se próximas a 90%, assim como a normalidade das larvas, o que demonstra não ter havido problemas nas taxas de produtividade com o uso destes crioprotetores, embora os parâmetros espermáticos cinéticos do sêmen criopreservado tenham sido inferiores ao fresco. Algumas avaliações de taxa de fertilização e eclosão e normalidade das larvas de sêmen criopreservado não foram realizadas em alguns trabalhos, tampouco com técnicas semelhantes às utilizadas no presente estudo com sêmen criopreservado em tubos criogênicos. Para tanto, os resultados obtidos foram superiores ao encontrados em trabalhos com fertilização artificial com utilizando sêmen fresco, como encontrado por Guerreiro et. al (2011), em que avaliaram o efeito da incubação de ovos de *P. mesopotamicus* em incubadoras do tipo Woynarovich com sêmen fresco e obtiveram $64,78 \pm 1,9$ para taxa de fertilização (%) e 86,35% de larvas normais 48 horas após a eclosão. Woynarovich (1986) afirma que as principais causas para deformidades em embriões e larvas de peixes são a insuficiência de oxigênio durante o cultivo e a carência de nutrientes essenciais na dieta dos reprodutores o que afeta a composição do vitelo quantitativa e qualitativamente.

O tipo de congelamento é um fator importante que pode influenciar na velocidade de congelamento e descongelamento do sêmen (RODINA et al., 2007). No presente experimento, o protocolo de criopreservação adotado (tipo de congelamento, tempo e temperatura de descongelamento) não influenciaram negativa sobre a motilidade espermática do sêmen criopreservado. Em vista disso, pode-se considerar a eficiência do uso de tubos criogênicos como recipientes de armazenamento durante o congelamento do sêmen, o que favorece o uso para espécies que apresentam alta fecundidade, como o *P. mesopotamicus*, onde requer um número maior de palhetas para fertilizar um grande número de oócitos. Estes fatores também reforçam a necessidade de haver estudos

relacionados à espécies diferentes para a formação de um protocolo específico para cada espécie.

Os efeitos ocasionados pelo congelamento e descongelamento sobre a célula espermática pode reduzir a atividade do espermatozoide, comportamento observado no presente estudo. Os efeitos positivos com o uso do metanol como crioprotetor intracelular podem ter sido ocasionados pela sua capacidade de penetração mais rápida, visto que, tornam-se mais favoráveis, porque encurtam o tempo de exposição do crioprotetor antes do resfriamento evitando danos osmóticos (KASAI et al., 1996). Além disso, também pode estar ligado à sua afinidade pela água intracelular, que detém as moléculas de água em seu interior, impedindo que ocorra a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, a solidificação do meio se estabelece com uma distribuição molecular desordenada da água, onde a substância assume o caráter de uma substância vítrea protetora (HUBÁLEK, 2003). A frutose usada como crioprotetor intracelular, possui baixo peso molecular e com isso tem capacidade de ultrapassar a membrana do espermatozoide (PURDY, 2006), atuando conseqüentemente na redução da formação de cristais de gelo na célula e também como fonte de energia para o espermatozoide, pois possui capacidade de fornecer substrato energético para as células germinativas masculinas. No entanto, a motilidade espermática pode ser influenciada por outros fatores que desencadeiam o início do movimento espermático e afetam sua duração, tais como as diferenças nas características físico-químicas do meio de ativação e plasma seminal (MORISAWA, 2008), como pressão osmótica, pH, osmolalidade e temperatura (ALAVI e COSSON, 2005; 2006). Viveiros e Godinho (2009) acrescentam que há possibilidade da composição do plasma seminal afetar a sensibilidade dos espermatozoides frente a ação dos crioprotetores. Estes fatores podem ser corroborados por Carolsfeld et al. (2003), que utilizaram um diluente composto por 5% de glicose, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de gema de ovo na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*, apresentando-se eficaz para a espécie.

Das soluções ativadoras testadas, a solução de frutose (2.5%) influenciou positivamente os parâmetros espermáticos obtidos para o sêmen criopreservado no presente experimento. As soluções ativadoras não iônicas, a base de açúcares são capazes de desencadear a motilidade espermática. Entre as soluções ativadoras que contém açúcares, a frutose tem se mostrado promissora, agindo na potencialização do movimento espermático (ADAMES et al., 2015), visto que, estas soluções podem servir como fonte de energia para os espermatozoides, sendo que o efeito crioprotetor está relacionado com

as concentrações utilizadas (GARCIA et al., 2016; ELLIOTT et al., 2017). A utilização de água destilada para ativação espermática é um fator que promove a cessação precoce da motilidade. Isso ocorre porque o meio de baixa osmolalidade (0 mOsm kg^{-1}) da água destilada é extremamente prejudicial à membrana plasmática dos espermatozoides, que possui maior pressão osmótica intracitoplasmática, que pode impedir a propagação das ondas e promover o encurtamento do flagelo e da curvatura em forma de alça (COSSON, 2010; ALAVI et al., 2009)

Outro fator a ser considerado é o tempo de equilíbrio, fator importante para ação dos crioprotetores durante o processo de criopreservação do sêmen, pois se trata do tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com os componentes do diluidor, antes do congelamento (BITTENCOURT et al., 2006). É durante esse período que ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no diluente seminal (SALAMON e MAXWELL, 2000). No presente estudo, foi utilizado um tempo de equilíbrio de quinze minutos, no qual o procedimento de envase dos tubos criogênicos foi realizado em uma caixa térmica a temperatura de aproximadamente 15°C , visto que, acima de 20°C o metanol é considerado tóxico. Conforme Maria et al. (2009), é importante determinar a taxa de descongelamento para uso do sêmen após o período de armazenamento em nitrogênio líquido. As palhetas normalmente para serem descongeladas uniformemente, são imersas em água no banho-maria, a temperatura de 45 a 60°C , de 3 a 8 segundos. Com criotubos, este processo se torna mais difícil pois o congelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rapidamente que a porção central. No presente estudo, o tempo de descongelamento do sêmen criopreservado em criotubos, não teve influência sobre os resultados de fertilização e normalidade das larvas, visto que, ambas apresentaram-se superiores a 90%.

Para tanto, os parâmetros espermáticos avaliados estão relacionados diretamente com a capacidade fertilizante do sêmen (VIVEIROS et al., 2010), o que pode-se observar no presente estudo que o processo de criopreservação reduziu a atividade do espermatozoide para os parâmetros de Motilidade (MOT), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade média da trajetória (VAP), Velocidade em linha reta (VSL), Retilinearidade (STR) e Progressão (PROG), assim como observado por Carvalho et al. (2011) que em estudo com a espécie surubim-do-Paraíba *Steindachneridion parahybae* observaram que a velocidade dos espermatozoides desta espécie foi influenciada conforme o crioprotetor utilizado no processo de criopreservação. Ao avaliar o comportamento espermático

criopreservado de surubim-do-Iguaçu *Steindachneridion melanodermatum*, Bombardelli et al. (2011) observaram variações de VCL e VSL em função de diferentes crioprotetores testados para a espécie, o que ocasionou a redução destas velocidades quando comparadas ao sêmen fresco. Isso reforça o comportamento eficaz do esperma contendo MET 10% + FRU 5,0% na criopreservação espermática de *P. mesopotamicus*. Além disso, Sanches et al. (2013) ressaltou que os espermatozoides de *Steindachneridion parahybae* apresentaram grande variação de VAP e VSL entre os machos em relação aos demais parâmetros de motilidade. Estes autores reforçam que o número de machos utilizados é importante e deve ser considerado em experimentos, visto que, há grande variabilidade no comportamento resultante entre os indivíduos, o que consequentemente, ocasionam a variação nos parâmetros espermáticos.

5. Conclusão

É possível obter larvas viáveis de *P. mesopotamicus* em escala comercial a partir de sêmen criopreservado em tubos criogênicos de 2,0 mL utilizando-se metanol (10%) + frutose (5,0%) como crioprotetores e frutose (2,5%) como solução ativadora.

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>.
- ADAMES, M. S.; DE TOLEDO, C. P.; 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. 119-28. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>.
- 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>.
- 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., RODINA, M., POLICAR, T., LINHART, O. 2009. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. **Comparative**

- Biochemistry and Physiology**, v.153, p.430 – 437.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.001>.
- AMANN, R. P., PICKETT, B. W. 1987. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-174.
[https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).
- AMANN, R, KATZ D. F. Reflections on CASA after 25 years. 2004. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x>.
- 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>.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.41, p.395-406, 1987.
- BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 22-31, 1992.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARÃES, J. D. 2006. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, p.27- 37.
- BOMBARDELLI, R. A., MÖRSCHBACHER, E. F., GOMES, E., NEUMANN, G., MARCOS, R. M., TOLEDO, C. P. R., TESSARO, L., MERTENZ, F., SANCHES, E. 2011. Milt cryopreservations protocols to iguaçu surubim (*Steindachneridion melanodermatum*). In: *World Aquaculture 2011*. World Aquaculture Society (WAS) (Ed.). WAS, Natal, Brazil, p.157.
- 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>.
- CARVALHO, I. C., ARAÚJO, R. V., CANEPPELE, D., VIVEIROS, A. T. M. 2011. Motilidade e velocidades espermáticas do sêmen criopreservado de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, avaliado através do Sistema Computadorizado (CASA). In: *III Conferência Latinoamericana Sobre Cultivo de Peixes Nativos e III Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos*. Universidade Federal de Lavras (UFLA) (Ed.). UFLA, Lavras, Brazil.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 49, 1998.
- COSSON, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v.76, p.240-279. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02504.x>.

- 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.
- ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. 2017. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v.76, p.74-91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>.
- FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709-714, 2007. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60672-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60672-4).
- FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p.45-53, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>.
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- FURUYA, W. M. **Espécies nativas**. In: Moreira, H. L. M.; Vargas, L., Ribeiro, R. P., Zimmermann, S. (Ed.). Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: ULBRA. pp. 83-90. 2001.
- 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>.
- GARCIA, R. F.; STREIT JR., D. P.; CABRITA, E.; GODOY, L. C. Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges, In: MARCO-JIMENEZ, F. (Ed.). Cryopreservation in Eukaryotes. London: InTech, p.57-73, 2016.
- GLOGOWSKI, J.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. 1999. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. **North American Journal of Aquaculture**, v.61, p.258-262. <https://doi.org/1811/37298>.
- GODINHO, H. P., GODINHO, A. L. 1986. Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. **Aquaculture**, v.55, p.69-73. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90057-8).
- GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, London, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.001>.
- GUERREIRO, L. R. J., DIAS, J. A. D., FORNARI, D. C., RIBEIRO, R. P., ZANONI, M. A. 2011. Incubation of eggs and larvae of pacu (*Piaractus mesopotamicus* holmberg, 1887) in israeli and woynarovich incubators. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 2, p. 781-794. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n2p789>.
- 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).
- 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>.
- KASAI, M., ZHU, S. E., PEDRO, P. B., NAKAMURA, K., EDASHIGE, K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v.33, p.459–464. <https://doi.org/10.1006/cryo.1996.0046>.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R. A. 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta* f. *fario* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp. **Aquaculture Research**, v.26, p.801-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00873.x>.
- 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.
- MARIA, A. N., AZEVEDO, H. C., CARNEIRO, P. C. F. **Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura**. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1 ed. Amapá: Embrapa Amapá, v. 1, p. 47-63. 2009.
- 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>.
- 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>.
- MYLONAS, C. C., GISSIS, A., MAGNUS, Y., ZOHAR, Y. 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. **Aquaculture**, v. 153, p. 301-311. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00021-5).
- NEUMANN, G., BOMBARDELLI, R. A., TOLEDO, C. P. R., SANCHES, E. A. **Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre**. 1ª ed. Toledo: LATRAAC/UNIOESTE, 86p. 2013.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- PAULINO, M. S., MURGAS, L. D. S., FELIZARDO, V. O., FREITAS, R. T. F. 2012. Anormalidades espermáticas de *Piaractus mesopotamicus* após descongelamento utilizando diferentes metodologias. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.64, n.6, p.1591-1596. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600027>.
- 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. 152p. 2022.
- 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>.
- ROBLES, V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HÉRRAEZ, M. P. 2003. Vitriification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Maryland Heights, v.47, n.1, p.30-39. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00066-X).
- RODINA, M., GELA, D., KOCOUR, M., ALAVI, H., HULAK, M., LINHART, O. 2001. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. **Theriogenology**, v. 55, p.751-769. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.007>.
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H. M., GUILHERME, M. C. M. 1990. 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.
- 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>.
- SALAMON, S., MAXWELL W. M. C. 2000. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X).
- 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., 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., 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>.
- 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. **Criopreservação de sêmen de peixes**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, GO. Palestras..., 2005.
- VIVEIROS, A. T.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.293-300. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.025>.
- VIVEIROS, A. T. M., GODINHO, H. P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.137-150. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>.
- VIVEIROS, A. T. M., NASCIMENTO, A. F., ORFÃO, L. H., ISAÚ, 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>.
- 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>.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, n.4, p. 871- 891. 1995.
- 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>.
- WOYNAROVICH, E. Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. Brasília: CODEVASF, Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco, p.42. 1986