

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**LAICIA CARNEIRO LEITE**

**TOXICIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE *Astyanax  
altiparanae* UTILIZANDO DIMETILSUFÓXIDO E METILGLICOL  
COMO CRIOPROTETORES**

**Ilha Solteira  
2019**

**LAICIA CARNEIRO LEITE**

**TOXICIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE *Astyanax altiparanae* UTILIZANDO DIMETILSUFÓXIDO E METILGLICOL COMO CRIOPROTETORES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira como parte das exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

Ilha Solteira  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

L533t Leite, Laicia Carneiro.  
Toxicidade e criopreservação do sêmen de *Astyanax altiparanae* utilizando dimetilsulfóxido e metilglicol como crioprotetores / Laicia Carneiro Leite. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2019  
73 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Ciência e Tecnologia Animal, 2019

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira  
Inclui bibliografia

1. Crioprotetor. 2. Characidae. 3. Toxicidade. 4. Aquicultura. 5. Qualidade seminal.

  
Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção  
Serviço Técnico de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
CRB/8 - 9999

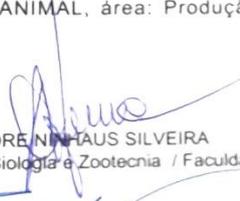
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

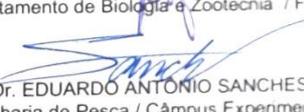
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Toxicidade e criopreservação do sêmen de *Astyanax altiparanae* utilizando dimetil sulfóxido e metil glicol como crioprotetores

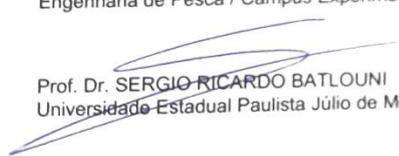
AUTORA: LAÍCIA CARNEIRO LEITE

ORIENTADOR: ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA  
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

  
Prof. Dr. EDUARDO ANTONIO SANCHES  
Engenharia de Pesca / Câmpus Expenmental de Registro - Unesp

  
Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura de Jaboticabal.

Ilha Solteira, 27 de fevereiro de 2019

*“Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois... a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor. ”*

Chico Xavier

### ***Dedicatória***

*Aos meus pais, Maria Lima Carneiro e Assunção Douro Leite, por me apoiar incondicionalmente, apesar da imensa saudade e preocupação devido à distância, a cada um dos meus irmãos pelo apoio, carinho e ajuda, e aos meus sobrinhos por serem o meu alívio nas horas difíceis, todos vocês são a motivação da minha luta.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus por me mostrar todos os dias o quanto me ama, por me iluminar nos momentos mais difíceis dessa trajetória, por ser meu amparo nos momentos em que não pude compartilhar minhas dores e tristezas. OBRIGADA.

A minha mãe Maria Lima Carneiro, por ser meu exemplo de mulher, guerreira, batalhadora, persistente, aquela que sempre me colocou a frente dos seus sonhos e da sua felicidade. Sei o quanto é difícil para você ficar longe tanto tempo, e mesmo assim você me apoiou e me motivou a vim, e a continuar nessa trajetória. Você é o motivo principal da minha luta. TE AMO INFINITAMENTE.

Ao meu pai Assunção Douro Leite, por ser meu exemplo de homem, por ser esse pai maravilhoso, por me apoiar incondicionalmente, por demonstrar em cada conversa o quanto tem orgulho da sua filha. Obrigada também por ser meu apoio financeiro, por me dar o pouco que você tem. TE AMO INFINITAMENTE.

Aos meus irmãos Claudia, Val, Audileia, Diego, Lineia e Deilane, por me apoiaram e me motivarem sempre, vocês são os melhores irmãos do mundo, sei que isso é clichê, mas é verdade, se pudesse escolher com certeza escolheria vocês, com as mesmas qualidades e os mesmos defeitos, pois é isso que tornam vocês os melhores. Vocês são mais que irmãos, são meus amigos. Peço desculpa por estar tão longe nos momentos difíceis e também nos momentos de felicidades. Vocês fazem uma falta enorme. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

Aos meus cunhados Fernando, Nonato e Mauro obrigado por cuidarem das minhas joias preciosas. Em especial ao Fernando por todas as ligações que tornaram meus dias mais felizes. A minha cunhadinha Antonia por cuidar do meu príncipe e por ser muito mais que uma cunhada, uma irmã. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

Aos meus sobrinhos Arthur, Guilherme, André, Valentina e Isis vocês são minha motivação diária, tudo o que faço é por vocês e para vocês. Obrigada por todos os sorrisos, por todas as alegrias, por todo carinho. Com vocês descobrir o melhor abraço, o melhor beijo, o melhor sorriso. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

A todos os meus amigos de Chapadinha por me apoiarem e estarem ao meu lado sempre. Em especial as minhas amigas Vanna Diniz e Andressa Douro por me apoiarem tanto, por não deixar a distância afetar nossa amizade, por tornar minhas férias sempre as melhores e mais intensas. Em todos os momentos vividos durante essa nova trajetória, vocês foram minha lembrança constante, vocês sabem o quanto queria

compartilhar pessoalmente cada alegria vivida durante essa nova trajetória. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

As minhas amigas Luciane Gomes, Lorena Frigini e Maria Angélica Dutra, Tatiana Santos com vocês compartilhei meus melhores momentos e minhas maiores alegrias durante essa nova trajetória. Obrigada por toda força, apoio, compreensão e motivação. E aos demais amigos Amanda Cristina, Laura, Mayre, Valdomiro e Fernanda obrigada por tudo. AMO VOCÊS INFINITAMENTE.

Ao Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO por todo aprendizado e ajuda e por dividir muitos momentos de alegria e trabalho. Em especial a Cris Bashio por todo ensinamento, paciência e ajuda. Á Lais Pedroso por toda ajuda e disponibilidade. Em especial também as minhas amigas Yasmin Alves e Malbelys Padilla por toda disponibilidade, por todas as conversas, por me motivarem a não desistir, por tornarem meus dias mais fáceis. OBRIGADA.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alexandre Ninhaus por aceitar me orientar, por todo os ensinamentos, paciência, atenção e compreensão. E também a Prof. Dra. Rosicleire Verissimo por toda ajuda.

Aos todos funcionários da UNESP/ Ilha Solteira por serem tão atenciosos desde os guardas, galera da limpeza, do café, os técnicos dos laboratórios e às professoras Flavia Lisoni pelo auxílio na realização do Ensaio Cometa, obrigada por toda paciência e ensinamento, à professora Gláucia Faria por toda a ajuda, atenção e paciência e a professora Wilma Buzetti por ceder o laboratório para as análises. OBRIGADA.

A Fapesp pelo apoio financeiro ao projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA pela bolsa concedida. OBRIGADA.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	CRIOPRESERVAÇÃO .....	14
1.2	CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES .....	21
1.3	CRIOPROTETORES MAIS UTILIZADOS EM PEIXES .....	22
1.4	OSMOLALIDADE .....	25
1.5	DILUIÇÃO.....	25
1.6	CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.....	26
1.7	VOLUME DAS PALHETAS .....	28
1.8	INTEGRIDADE DE DNA .....	28
1.9	MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE PEIXES .....	29
1.10	<i>Astyanax altiparanae</i> (GARUTTI E BRITSKI, 2000).....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	GERAL .....	32
2.2	ESPECÍFICOS.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.2	INDUÇÃO HORMONAL .....	33
3.3	COLETA DO SÊMEN .....	33
3.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS .....	34
<b>3.4.1</b>	<b>Sêmen fresco</b> .....	34
<b>3.4.2</b>	<b>Soluções crioprotetoras</b> .....	35
<b>3.4.3</b>	<b>Teste de toxicidade</b> .....	36
<b>3.4.4</b>	<b>Congelamento</b> .....	36
<b>3.4.5</b>	<b>Pós-descongelamento</b> .....	36
3.5	INTEGRIDADE DE DNA .....	37
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
4.1	CARACTERÍSTICAS SEMINAIS .....	39
4.2	TESTE DE TOXICIDADE .....	39
4.3	DESCONGELAMENTO DO SÊMEN .....	44
4.4	INTEGRIDADE DE DNA.....	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47

5.1	CARACTERÍSTICAS SEMINAIS .....	47
5.2	TESTE DE TOXICIDADE .....	48
5.3	MOTILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO.....	50
5.4	INTEGRIDADE DE DNA .....	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

## RESUMO

A criopreservação é uma tecnologia empregada para preservação de células, tecidos e embriões em baixas temperaturas. Para o desenvolvimento de tal tecnologia de preservação seminal, é necessário o conhecimento sobre as características seminais da espécie que se pretende trabalhar, o estabelecimento de soluções diluentes que protegerão as células espermáticas e, dos respectivos protocolos de resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen criopreservado. As soluções crioprotetoras devem ser atóxicas para às células espermáticas, mantendo as características do fluido seminal. Assim, este trabalho teve por objetivos além de conhecer as características seminais do sêmen de *Astyanax altiparanae*, desenvolver um protocolo eficiente para a criopreservação seminal da espécie e sua utilização posterior. Para isso, exemplares adultos e maduros de *A. altiparanae* foram induzidos hormonalmente à reprodução com Ovopel<sup>®</sup>, sendo o sêmen coletado após 226 horas-grau em com auxílio de micropipetas. Deste foram avaliadas as características seminais como, osmolalidade, concentração espermática, motilidade espermática subjetiva e motilidade objetiva e vários outros aspectos de cinética dos espermatozoides pelo uso do CASA (Integrated Semen Analysis System). Foram avaliadas dez soluções crioprotetoras compostas por três bases diluentes **A** (5% de glicose + 10% gema de ovo), **B** (Bestville Thawing Solution (BTS<sup>®</sup>) a 5%) e **C** (5% de glicose), combinadas com um crioprotetor interno dimetilsulfóxido ou metilglicol, em concentrações de 10% e 15%. A eficiência destas soluções foi avaliada pela análise da motilidade espermática computadorizada. Para a criopreservação, o sêmen foi diluído na proporção de 1:25 (sêmen:diluyente), envasado em palhetas de 0,25 mL e congelados em vapores de nitrogênio líquido. Também foi avaliada a integridade do DNA dos espermatozoides após descongelamento, pelo teste cometa. O sêmen apresentou-se translúcido, com consistência pouco viscosa, obtendo cerca de 30 µL de sêmen por macho. A osmolalidade média foi de 219±0,03 mOsm/kg, a concentração espermática média foi de 7,22±3,1 x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL. A motilidade subjetiva média foi de 65%, com tempo de duração de motilidade de 33±2,2 segundos. Os valores médios obtidos pela análise do sêmen fresco com o ISAS<sup>®</sup> CASA foram: motilidade total 79,72±7,6%, motilidade progressiva 54,10±8,8%, foram mensurados ainda as velocidades, VCL (47,28±15,8 µm/s), VSL (35,77±12,4 µm/s) e VAP (43,37±15,0 µm/s), LIN (75,5±6,1%), STR (82,6±4,3%), WOB (91,2±2,9%), ALH (1,3±0,1 µm) e BCF (6,9±0,3 Hz). Com relação a toxicidade os tratamentos T7 (DMSO 10% + C), T4 (MTG15% + A) e T6 (DMSO15% + B) foram os que propiciaram melhores resultados pós diluição ao sêmen de *A. altiparanae*, apresentando valores médios de motilidade total (MT) para **T7** de 68,95±14,8%, **T4** – MT de 61,77±4,6%, **T6** - MT de 59,42±12,7%, não apresentando diferença significativa entre si. No que se refere a análise de motilidade pelos métodos subjetivo e objetivo (ISAS<sup>®</sup> CASA), o método objetivo registrou os maiores valores. Os processos de criopreservação e de descongelamento não foram eficazes em manter o sêmen viável, nos tratamentos testados não foi detectado motilidade e capacidade de fertilização. Com relação a integridade do DNA, nos tratamentos T1, T3, T5 e T6 foram detectados menores índices de danos.

Palavras-chave: Characidae, soluções crioprotetoras, aquicultura, qualidade seminal

## ABSTRACT

Cryopreservation is a technology used to preserve cells, tissues and embryos at low temperatures. For the development of such seminal preservation technology, it is necessary to know the seminal characteristics of the species to be worked on, the establishment of diluent solutions that will protect the sperm cells, and the respective protocols of cooling, freezing and thawing of the cryopreserved semen. Cryoprotective solutions should be non-toxic to sperm cells, while maintaining seminal fluid characteristics. Thus, this work had as objectives besides knowing the seminal characteristics of *Astyanax altiparanae*, to develop an efficient protocol for the seminal cryopreservation of the species for its later use. For this, adult and mature *A. altiparanae* specimens were hormonally induced to Ovopel<sup>®</sup> reproduction, and the semen was collected after 226 hours-degree with the help of micropipettes. Seminal characteristics such as osmolality, sperm concentration, subjective sperm motility and objective motility, and several other aspects of sperm kinetics were evaluated using CASA (Integrated Semen Analysis System). Ten cryoprotectant solutions composed of three diluent bases **A** (5% glucose + 10% egg yolk), **B** Bestville Thawing Solution (BTS<sup>®</sup>) 5% and **C** (5% glucose), combined with a cryoprotectant internal dimethylsulfoxide or methylglycol, in concentrations of 10% and 15%. The efficiency of these solutions was evaluated by the analysis of the computerized sperm motility. For cryopreservation, the semen was diluted 1:25 (semen: diluent), packed in 0.25 mL vats and frozen in liquid nitrogen vapors. The integrity of sperm DNA after thawing was also evaluated by the comet test. The semen was translucent, with little viscous consistency, obtaining about 30  $\mu$ L of semen per male. The mean osmolality was  $219 \pm 0.03$  mOsm / kg, the mean sperm concentration was  $7.22 \pm 3.1 \times 10^9$  spermatozoa / mL. The mean subjective motility was 65%, with a motility duration of  $33 \pm 2.2$  seconds. The mean values obtained by analysis of fresh semen with ISAS<sup>®</sup> CASA were: total motility  $79.72 \pm 7.6\%$ , progressive motility  $54.10 \pm 8.8\%$ , (VLC ( $43.77 \pm 15.4 \mu\text{m/s}$ ) and VAP ( $43.37 \pm 15.0 \mu\text{m/s}$ ), LIN ( $75.5 \pm 6.1\%$ ), STR ( $82.6 \pm 4.3\%$ ), WOB ( $91.2 \pm 2.9\%$ ), ALH ( $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) and BCF ( $6, 9 \pm 0.3$  Hz). As regards toxicity, **T7** (DMSO 10% + C), **T4** (MTG15% + A) and **T6** (DMSO15% + B) treatments provided the best post-dilution results to *A. altiparanae* semen, presenting mean values of total motility (MT) for T7 of  $68.95 \pm 14.8\%$ , T4 - MT of  $61.77 \pm 4.6\%$ , T6 - MT of  $59.42 \pm 12.7\%$ , with no significant difference between them. Regarding the analysis of motility by subjective and objective methods (ISAS<sup>®</sup> CASA), the objective method recorded the highest values. The cryopreservation and thawing processes were not effective in keeping the semen viable, in the treatments tested no motility and fertilization capacity were detected. Regarding DNA integrity, T1, T3, T5 and T6 treatments showed lower rates of damage. Key words: Characidae, cryoprotectant solutions, aquaculture, seminal quality

## 1 INTRODUÇÃO

Os peixes compõem o grupo de vertebrados mais diversificado, possuindo cerca de 34.000 espécies (FROESE; PAULY, 2019), o que representa cerca de cinquenta por cento dos vertebrados, estando distribuídos nos mais diversos ambientes. A região Neotropical, que se estende desde o México até a América do Sul, detém cerca de 5.617 espécies de peixes de água doce. No entanto, acredita-se que essa diversidade seja ainda maior, devido ao aumento e rapidez na descrição das espécies nos últimos anos, estimando-se que este número ultrapasse 8.000 espécies (REIS *et al.*, 2016). Esse crescimento é perceptível quando comparamos este levantamento acima citado com o feito por Reis *et al.* (2003), que continha cerca de 4.475 espécies válidas para Região Neotropical, sendo que na última década 1.142 novas espécies já foram descritas.

Essa diversidade de peixes está distribuída em diversas famílias, sendo com maior representação nas famílias Characidae, com 952 espécies, Loricariidae, com 673 e Cichlidae, com ao redor de 406 espécies de peixes de água doce (REIS *et al.*, 2003). Tal biodiversidade ictiofaunística é uma característica da Região Neotropical sendo este um dos motivos pelo quais o Brasil é considerado um país com alta riqueza e diversidade de peixes. Assim, a biodiversidade brasileira está representada principalmente no ambiente de água doce com 2.587 espécies descritas até o final do ano de 2006 (BUCKUP *et al.*, 2007). No entanto, de acordo com os dados disponíveis no Fishbase, este número já seria de 3.417 espécies.

### 1.1 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é a técnica na qual células ou tecidos são congelados em temperatura ultrabaixas, mantendo sua viabilidade biológica para posterior utilização. Um dos primeiros relatos sobre o uso desta técnica foi feito por Spallanzani em 1776 citado de Barkay, Zuckerman e Heiman (1974), que observou espermatozoides humanos móveis após o congelamento utilizando neve. Luyet e Hodapp (1938) relataram que espermatozoides de rã parcialmente desidratados com sacarose, imergidos em ar líquido e descongelados em seguida em um meio de 20°C, apresentaram movimento. Jahnel (1938) também relatou que espermatozoides

humanos congelados em nitrogênio líquido em  $-196^{\circ}\text{C}$  apresentaram motilidade após o congelamento.

Shaffner, Henderson e Card (1940) descobriram que cerca de 30% dos espermatozoides de aves submetidos a uma temperatura de  $-76^{\circ}\text{C}$ , também tinham motilidade quando descongelados, porém, não apresentavam capacidade de fertilização. Parkes (1945) verificou que a taxa de sobrevivência de espermatozoides humanos congelados a  $-196^{\circ}\text{C}$  eram maiores quando congelados em ampolas do que em tubos capilares. Contudo, todos os trabalhos citados, apesar de demonstrarem sobrevivência das células submetidas a baixas temperaturas, apresentavam baixas taxas de motilidade espermática e células inviáveis para o processo de fertilização.

Porém, na década de 50, a técnica teve um grande avanço, isto porque Polge, Smith e Parkes (1949) descobriram que o glicerol era capaz de proteger células em baixas temperaturas e, esta descoberta, abriu caminhos para execução de novos trabalhos que estudaram o processo e os efeitos da criopreservação.

A partir destes resultados, Smith e Polge (1950) estudaram a criogenia de espermatozoides de cavalo, porquinho-da-índia, coelho e aves utilizando o glicerol e verificaram que estes têm repostas diferentes, de acordo com a concentração usada para cada espécie e, que os melhores resultados ocorreram ao usar um resfriamento mais lento a partir de  $-79^{\circ}\text{C}$ , do que o congelamento rápido. Lovelock e Polge (1954) também confirmaram a ação protetiva do glicerol, trabalhando com sêmen de bovino, arenque, coelho e aves. A ação protetora do glicerol também foi observada em glóbulos vermelhos (LOVELOCK, 1953).

O glicerol também foi testado em tecidos ovarianos de ratos que foram congelados e após o descongelamento enxertados em ratos, sendo observados enxertos funcionais (DEANESLY, 1954). Silva *et al.* (2003) utilizaram o glicerol como crioprotetor para sêmen canino e observaram que após o descongelamento a viabilidade espermática só foi mantida por 15min. Em bovinos, foi verificado que o glicerol protege a membrana acrossomal dos espermatozoides (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999). Amirat *et al.* (2004) também utilizou glicerol no congelamento do sêmen bovino e obteve uma taxa de motilidade pós descongelamento de 54%.

Essa proteção proporcionada as células pelo glicerol é atribuída a sua capacidade de ligar-se com a água e por ter baixa dissociação com sais, diminuindo

a osmolalidade do meio de congelação, evitando assim o choque osmótico. Este interage com as moléculas de água, penetrando assim na célula e estabilizando a membrana plasmática, sendo o crioprotetor mais utilizado na criopreservação de sêmen de mamíferos (SILVA *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2011a).

Outros crioprotetores também foram testados, como propilenoglicol e etilenoglicol para sêmen de aves, cavalos e coelho, demonstrando resultados similares ao glicerol (SMITH; POLGE, 1950). Moraes *et al.* (1998) verificaram que o etilenoglicol, assim como o glicerol, protegem o sêmen de ovino, no entanto o etilenoglicol proporcionou melhor proteção acrossomática.

O dimetilsulfóxido (DMSO) também foi testado no congelamento de folículos primários de camundongos, que se desenvolveram após o descongelamento gerando oócitos viáveis para fertilização (CARROLL *et al.*, 1990). O DMSO também foi utilizado na criopreservação de tecido ovariano de bovino, porém foi observado que a quantidade de folículos normais foi reduzida (PAYNTER *et al.*, 1999).

As amidas também foram utilizadas em sêmen de garanhões, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a utilização do crioprotetor dimetilformamida (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Outra substância crioprotetora testada foi o metanol utilizado na criopreservação de embriões de camundongos proporcionando uma porcentagem de desenvolvimento de 48%, já para embriões de bovinos, não houve taxa de sobrevivência após o processo de criopreservação, mostrando que o metanol causou toxicidade nos embriões de bovinos (JAUME; CAMPOS, 1990). Para equinos a criopreservação de embriões com uso do metanol resultou na taxa de sobrevivência de 23% (BASS *et al.*, 2004).

Além dos trabalhos citados acima, muitas pesquisas foram desenvolvidas com o sêmen de animais domésticos, podendo destacar: com cães (OLIVEIRA *et al.*, 2006; GODIM *et al.*, 2009), bovinos (GUTHRIE; LIU; CRISTER, 2002), cavalos (VIDAMENT *et al.*, 2002; SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004), coelhos (DALIMATA; GRAHAM 1997; HINSCH *et al.*, 1997; KASHIWAZAKI *et al.*, 2006; OKUDA *et al.*, 2007), suínos (BIANCHI *et al.*, 2008) e ovinos (SILVA *et al.*, 2012)

Os agentes crioprotetores como glicerol, DMSO, metanol, dimetilacetamida, entre outros, são classificados em intracelulares ou permeáveis, pois possuem

moléculas pequenas, baixo peso molecular, alta solubilidade, atuando na redução do ponto de congelamento e diminuindo assim, a formação de cristais de gelo (GONZALEZ, 2004). Na maioria dos estudos, estas substâncias são utilizadas juntamente com um crioprotetor extracelular ou não permeável, que são compostos de moléculas grandes que, além de auxiliar na desidratação celular, atuam na proteção estrutural da membrana plasmática, no fornecimento de energia para a célula e na homeostase osmótica, sendo normalmente compostos a base de açúcares, proteínas ou sais (WATSON 1995), dentre os quais podemos citar a glicose, o leite em pó, a água de coco e a gema de ovo.

A adição de crioprotetores não permeáveis podem maximizar o sucesso do processo de criopreservação. Aboagla e Terada (2004) demonstraram que a adição da gema de ovo ao diluente para sêmen de caprino produziu um aumento na taxa de motilidade (73%) após o descongelamento, em comparação com o extensor sem gema de ovo (10%). Isso também foi confirmado para sêmen de touro holandês, em que a adição de frutose ao diluente proporcionou uma melhoria na motilidade pós descongelamento (FOOTE; KAPROTH, 2002).

Os crioprotetores não permeáveis por atuarem diretamente na membrana dos espermatozoides, dão estabilidade a esta, auxiliando na manutenção da morfologia dos espermatozoides durante o processo de criopreservação. Isto foi observado em sêmen de cães diluídos em solução composta por Tris + água de coco (SILVA; CARDOSO; SILVA, 2006) e, em sêmen de carneiro diluídos a base de trealose (AISEN *et al.*, 2005), que tiveram uma ampliação da porcentagem de células espermáticas com membranas intactas após o descongelamento.

Além dos estudos citados acima, pode-se destacar trabalhos que também investigaram o efeito protetor de diferentes soluções crioprotetoras (GEBAUER *et al.*, 1970; COCHRAN *et al.*, 1983; FOOTE; ARRIOLA, 1987; LEEUW *et al.*, 1993; AZEVÊDO; TONIOLLI, 1999; GIL *et al.*, 2000; SILVA; CARDOSO; SILVA, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2001; AIRES *et al.*, 2003; MUIÑO; FERNÁNDEZ; PEÑA, 2007; SNOECK; HENRY; MELO, 2007; TONIOLLI *et al.*, 2010; JAFAROGHLI *et al.*, 2011; PAPA *et al.*, 2011; TUNCER *et al.*, 2013;).

A adição destes compostos minimiza os danos que os processos de congelamento e descongelamento podem causar as células (HARVEY *et al.*, 1987),

uma vez que atuam protegendo as estruturas das células do frio e diminuindo o ponto de congelamento, minimizando a formação de cristais de gelo.

No entanto, apesar do principal objetivo dos crioprotetores serem proteger as células durante o processo de criopreservação, Fahy (1986), levantou a hipótese de que a adição de crioprotetores pode ser tóxica às células espermáticas. O glicerol por exemplo, apesar de proporcionar uma boa taxa de motilidade para o sêmen de caprino também ocasionou os maiores índices de alterações patológicas (BITTENCOURT *et al.*, 2004), impedindo o sucesso da fertilização.

Além disso, a concentração de crioprotetor utilizada também pode ocasionar toxicidade, fato confirmado para o sêmen de ovino das raças Ile de France, Romney e Merino Booroola, onde o aumento da concentração de etilenoglicol diminuiu a motilidade e aumentou a porcentagem de alterações do acrossoma (MORAES *et al.*, 1998).

O efeito diferente do crioprotetor nas diferentes espécies pode ser explicado pelo fato das espécies possuírem características biofísicas diferentes, com relação ao volume celular, volume de água, superfície celular e permeabilidade da membrana celular (CURRY *et al.*, 1996; HOLT, 2000), o que resulta em respostas diferentes a cada crioprotetor.

Smith e Polge (1950), enfatizaram que a não viabilidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação, estaria relacionado a ação de agentes físicos e químicos, como concentração do crioprotetor, brusca mudança de temperatura e a formação de cristais de gelo intra e extracelularmente.

Quando as células são submetidas a baixas temperaturas a mudança do estado da água de líquida para sólida ocasiona a formação dos cristais devido ao estresse osmótico. A formação dos cristais de gelo está diretamente relacionada com a velocidade de congelamento e de descongelamento. O congelamento rápido produz cristais menores e um congelamento muito lento provoca a formação de cristais maiores. No processo o descongelamento muito rápido ou lento pode causar a recristalização das células (PARKES; GRAHAM, 1992; BAILEY; MORRIER; CORMIER, 2003).

A taxa ótima de resfriamento está diretamente ligada a permeabilidade da membrana celular e sua capacidade de manter o equilíbrio osmótico com a solução

extracelular, uma vez que é esta que permitirá a retirada da água intracelular e a entrada do crioprotetor por osmose (HARVEY *et al.*, 1987).

O resfriamento deve ser realizado em uma velocidade que permita a maximização da perda da água interna e o estabelecimento de um equilíbrio de solutos entre os meios intra e extracelular, impedindo a formação de gelo intracelularmente (MAZUR, 1977, 1984). Assim, o resfriamento muito lento ou muito rápido poderá afetar a taxa de desidratação, e a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo, sendo prejudicial às células. A determinação das velocidades de congelamento e de descongelamento é um fator fundamental para a viabilidade do sêmen descongelado (AMANN; PICKETT, 1987).

De acordo com Fiser e Fairfull (1990) ao trabalhar com sêmen de javalis de Yorkshire e Kumar, Millar e Watson (2003) que trabalhou com criopreservação do sêmen de bovino, foram identificados os melhores resultados com uma taxa de congelamento de 30°C/min. No entanto para cavalos (ganhão) esta taxa pode ser de 5 a 45 °C/min (MOORE *et al.*, 2006), o que indica que a taxa de congelamento pode variar de acordo com a espécie, sendo importante determinar estas especificidades.

Todos esses efeitos citados podem ser letais para tecidos, células e embriões tornando-os inviáveis para posterior utilização. No caso dos espermatozoides, os danos afetam principalmente dois parâmetros, a motilidade e a capacidade de fertilização. Segundo Watson (1995), o processo de criopreservação torna cerca de 50% dos espermatozoides imóveis, sendo que muitos dos que sobrevivem ainda podem ter alguma crioinjúria que afetará a capacidade de fertilização.

A importância da motilidade espermática está diretamente ligada a necessidade que o espermatozoide tem de encontrar o ócito, para que ocorra a fecundação, assim a motilidade espermática é a principal característica seminal podendo estar relacionada com a taxa de fertilização. (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Esta correlação é corroborada por vários autores como: Fetterolf e Rogers (1990) e Marshburn *et al.* (1992) para espermatozoides de humanos. Luz, Neves e Gonçalves, (2000), verificaram em carneiros da raça Corriedale que as maiores taxas de motilidade progressiva (> 40%) corresponderam também a maior taxa de prenhez (68%). Correa, Pace e Zavos (1997) verificaram que em touros holandeses a alta fertilidade foi mais

correlacionada com a maior motilidade, do que os outros parâmetros seminais avaliados.

No entanto, nem sempre alta taxa de motilidade significa boa fertilização, pois espermatozoides móveis podem ter outros defeitos, como o de integridade da membrana que pode afetar a fertilidade. Siqueira *et al.* (2007) avaliando a correlação da prenhez bovina com a motilidade espermática do sêmen criopreservado, obteve resultados negativos, mostrando que alta taxa de motilidade não significa grande quantidade de prenhez, indicando que além destes, muitos outros fatores estão envolvidos e devem ser levados em conta.

Assim para garantir a eficácia da fertilização, os espermatozoides precisam ter características como: motilidade progressiva, energia para executar os processos celulares, manter a integridade da membrana e do acrossomo, incluindo as características químicas de suas enzimas (LAYEK *et al.*, 2016).

Após a descoberta do efeito protetor do glicerol na década de 50, o uso da tecnologia de criopreservação aumentou substancialmente, e esse crescimento é explicado pelo fato da tecnologia permitir a preservação de tecidos, por maximizar a fertilização em humanos, favorecer a criação de animais de importância agrícola e por ser uma ferramenta de preservação de espécies (WATSON, 2000).

Além de ajudar a aumentar a produção das indústrias de laticínios, carnes bovina, suína e caprina, através da melhoria na reprodução e seleção de reprodutores, para melhor atender as exigências do mercado. Vem sendo também utilizada como uma ferramenta complementar a inseminação artificial, pois com o sêmen congelado é possível transportar e utilizar o sêmen da espécie coletada mesmo após a morte do reprodutor, além de diminuir o custo com os animais (BAILEY; MORRIER; CORMIER, 2003), sendo uma importante ferramenta auxiliar para o melhoramento genético de espécies de interesse econômico.

Com o avanço da técnica e aumento pela procura de peixes para alimentação, setor impulsionado pela expansão da aquicultura, com destaque para a piscicultura. Os protocolos de criopreservação foram sendo adaptados para peixes a partir dos protocolos desenvolvidos para mamíferos, fazendo as adaptações quanto ao tipo de substância crioprotetora, suas concentrações e soluções diluidoras.

## 1.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES

Dois fatores principais foram responsáveis pela utilização da técnica de criopreservação nos peixes, o primeiro está relacionado a alteração ambiental nos estoques de peixes pela intervenção humana, que estão colocando em risco a variabilidade genética das espécies e faz necessário a criação de um banco de germoplasma, para evitar a perda desta biodiversidade, pois segundo o ICMBio/MMA (2016) existem 311 espécies de peixes continentais ameaçadas de extinção, com 100 espécies criticamente em perigo, 112 em perigo e 99 em estado de vulnerabilidade.

E o segundo fator foi o grande crescimento da aquicultura, que foi impulsionado pela queda da produção pesqueira, a possibilidade de explorar o potencial hídrico do país e, a busca por alimentos mais saudáveis, uma vez que os peixes possuem baixo teor de gordura e riqueza de ácido graxos (ômega 3), que são essenciais para garantir uma boa saúde (SCHULTER; VIEIRA-FILHO, 2017). Para o desenvolvimento da piscicultura há a necessidade de melhorar o processo reprodutivo em cativeiro, neste sentido, a formação de bancos de germoplasma de peixes possibilita eliminar a assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, reduz os gastos com a manutenção de um grande número de reprodutores em cativeiros e facilita o processo de melhoramento genético das espécies e, conseqüentemente, aumenta a produção das pisciculturas (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2002).

As pesquisas de criopreservação com peixes iniciaram com espécies marinhas, principalmente com as de importância econômica. O primeiro trabalho publicado de criopreservação de sêmen de peixe foi de Blaxter (1953), que congelou espermatozoides de *Clupea harengus* L., para viabilizar o cruzamento de dois arenques que tem desova em épocas diferentes, obtendo uma taxa de fertilização de 80 e 85%, no entanto a taxa de eclosão foi de apenas 5%. Desde então, a técnica foi aplicada a diversas espécies de peixes, sendo pouco a pouco aperfeiçoada, podendo citar Hoyle & Idler (1968) que testaram a utilização de etilenoglicol no congelamento de sêmen salmão do atlântico (*Salmo salar*) obtendo baixas taxas de motilidade e fertilização (< 30%) e, em 1984, Alderson e Macneil conseguiram melhorar a taxa de fertilização para mesma espécie, utilizando dimetilsulfóxido como crioprotetor e gema de ovo e glicose na composição do diluente seminal.

A partir destes trabalhos iniciais outros trabalhos foram realizados com espécies de peixes marinhos como: *Lates calcarifer* (LEUNG, 1987), *Epinephelus malabaricus* (GWO 1993; CABRITA *et al.*, 2009), *Centropomus parallelus* (TIBA *et al.*, 2009), *Gadus morhua* L. (BUTTS *et al.*, 2010), *Lutjanus synagris* (GAITÁN-ESPITIA *et al.*, 2013; SANCHES *et al.*, 2015), *Sparus aurata* L. (FABBROCINI *et al.*, 2015) e *Epinephelus akaara* (AHN; PARK, LIM, 2018).

Com relação aos estudos com sêmen de peixes de água doce, estes também tiveram início com espécies de grande importância econômica como *Cyprinus carpio* (SNEED; CLEMENS, 1956), *Salmo gairdneri*, *Salmo trutta fario* L. e *Salvelinus fontinalis* (STEIN; BAYRLE, 1978), *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus* (RANA; MCANDREW, 1989) e *Clarias gariepinus* (RURANGWA *et al.*, 2000).

No Brasil, pesquisas em criopreservação de sêmen em espécies de peixes neotropicais começaram a ser publicadas a partir da década de 80, podendo citar: Coser, Godinho e Ribeiro (1984) com congelamento de sêmen do curimatá (*Prochilodus scrofa*) e dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), Fogli da Silveira, Kavamoto e Narahara (1985) com a espécie *Rhamdia hilarii*. Carolsfeld *et al.* (2003) com espécies migratórias, Godinho, Amorim e Peixoto (2003) com *Oreochromis niloticus*, Murgas, Franciscatto e Santos (2003) com *Brycon orbignyanus* e Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) com *Brycon cephalus*.

### 1.3 CRIOPROTETORES MAIS UTILIZADOS EM PEIXES

Entre os crioprotetores permeáveis utilizados na criopreservação de sêmen de peixes de água doce, estão o dimetilsulfóxido (DMSO), metilglicol, etilenoglicol, metanol, propilenoglicol e a dimetilformamida. A escolha do crioprotetor a ser utilizado no congelamento de sêmen de peixe, deve levar em consideração as características seminais das espécies, que variam entre as ordens, famílias e espécies. Por exemplo, para Characiformes, os crioprotetores que oferecem maior proteção são o DMSO e metilglicol (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; VIVEIROS *et al.*, 2009b; NASCIMENTO *et al.*, 2010). O etilenoglicol também tem produzidos resultados satisfatórios para o sêmen de Characiformes (MENEZES *et al.*, 2008; PINEDA-SANTIS, *et al.*, 2015).

Já para siluriformes o crioprotetor usado com maior sucesso é o metanol (VIVEIROS; SO; KOMEN, 2000; CAROLSFELD *et al.*, 2003; LANG; CHANDLER; TIERSCH, 2003). O metanol também foi usado com sucesso para peixe da ordem Perciformes (HARVEY, 1983; NAVARRO *et al.*, 2014).

Em relação aos crioprotetores impermeáveis ou externos, podem ser citados: a gema de ovo, o leite em pó, a glicose e a água de coco (MELO; GODINHO, 2006; LEITE *et al.*, 2011a; NASCIMENTO *et al.*, 2012)

Assim como para mamíferos, o aumento na concentração do crioprotetor pode ser tóxico para o sêmen de peixe reduzindo drasticamente a motilidade espermática, inviabilizando o processo de criopreservação. Este fato foi relatado por vários autores, podendo citar: Ribeiro e Godinho (2003) para piau-açu (*Leporinus macrocephalus*), Cruz-Casallas *et al.* (2006) com *Brycon amazonicus*, Arciniegas, Rodríguez e Cruz-Casallas (2005) para *Pseudoplatystoma fasciatum* e, Cuevas-Uribe *et al.* (2011) para *Ictalurus punctatus*.

Além desses crioprotetores citados acima, o Bestvile Thawing Solution (BTS®), que é um diluidor que possui em sua composição 80% de glicose e foi desenvolvido primeiramente para o sêmen de suínos, tem sido bastante utilizado para proteger o sêmen de peixes durante o processo de criopreservação mostrando resultados superiores a outros diluidores. Dentre as espécies que o BTS foi usado como diluidor, podem ser citadas *Brycon orbignyanus* (MARIA *et al.*, 2006b), *Salminus brasiliensis* (VIVEIROS *et al.*, 2009a), e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS *et al.*, 2009b).

Diversos outros estudos já foram realizados visando encontrar os melhores crioprotetores de acordo com a espécie, sendo estabelecidos diversos protocolos eficazes (Tabela 1).

**Tabela 1** - Estudos de criopreservação realizados nas últimas décadas com sêmen de diversas espécies de peixes de água doce.

Espécie	Solução Crioprotetora	Referência
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	DMSO 7% + Gema de ovo 10%	Cabrira <i>et al.</i> (2001)
<i>Prochilodus lineatus</i> , <i>Piaractus mesopotamicus</i> , <i>Salminus maxillosus</i> , <i>Leporinus elongatus</i>	DMSO 10% + Gema de ovo 10% + Glicose 5%	Carolsfeld <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Metanol 10% + leite em pó 15%	Carolsfeld <i>et al.</i> (2003)
<i>Oreochromis niloticus</i>	DMSO 10% + Gema de ovo 10% + 5% Glicose	Godinho, Amorim e Peixoto (2003)
<i>Brycon orbignyanus</i>	DMSO 10% + Glicose 5% + 10% Gema de ovo	Murgas, Franciscatto e Santos (2003)
<i>Piaractus brachypomus</i>	DMSO 5% + 5,4 g de Glicose + 0,8 g de NaCl + 15% de gema de ovo	Fresneda <i>et al.</i> (2004)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Metilglicol 10% + BTS	Maria <i>et al.</i> (2006b); Viveiros <i>et al.</i> (2015)
<i>Brycon cephalus</i>	DMSO 10% + Glicose + Gema de ovo	Ninhaus-Silveira <i>et al.</i> (2006)
<i>Prochilodus lineatus</i>	DMSO ou Metanol 10% + BTS	Murgas <i>et al.</i> (2007); Viveiros <i>et al.</i> (2015)
<i>Brycon nattereri</i>	Metilglicol 10% + BTS	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
<i>Leporinus obtusidens</i>	DMSO 10% + Glicose 5% + Gema de ovo 10%	Taitson, Chami e Godinho (2008)
<i>Salminus brasiliensis</i>	DMSO 10% + Glicose	Viveiros <i>et al.</i> (2009a)
<i>Prochilodus lineatus</i>	Metilglicol 10% + Glicose 5%	Viveiros <i>et al.</i> (2009b)
<i>Xiphophorus couchianus</i>	Glicerol 14% + HBSS	Yang <i>et al.</i> (2009)
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Metanol 10% + Glicina 5%	Yasui <i>et al.</i> (2009)
<i>Piaractus brachypomus</i>	Metilglicol + Glicose	Nascimento <i>et al.</i> (2010)
<i>Prochilodus lineatus</i>	Metilglicol + Água de coco	Viveiros <i>et al.</i> (2010)
<i>Danio rerio</i>	Metanol 8% + HBSS	Yang <i>et al.</i> (2016)
<i>Brycon insignis</i>	Metilglicol + NaCl 0,29%	Viveiros <i>et al.</i> (2011)
<i>Colossoma macropomum</i>	Metilglicol 10% + Glicose 5% + Gema de ovo 5%	Carneiro <i>et al.</i> (2012)
<i>Colossoma macropomum</i>	Dimetilformamida + BTS	Varela-Junior <i>et al.</i> (2012)
<i>Brycon opalinus</i>	Metilglicol + Glicose	Viveiros <i>et al.</i> (2012)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Metanol 7,5% + Glicose	Cierieszko <i>et al.</i> (2014); Nynca <i>et al.</i> (2017)
<i>Cyprinus carpio</i>	DMSO 10% + Água de coco	Linhares <i>et al.</i> (2015)
<i>Brycon orbignyanus</i>	Metilglicol 10% + NaCl	López, Leal e Viveiros (2015)
<i>Brycon henni</i>	Etilenoglicol ou DMSO 5% + Gema de ovo 5%	Pineda-Santis <i>et al.</i> (2015)
<i>Coregonus lavaretus</i>	Metanol 9% + Glicose	Dietrich <i>et al.</i> (2016)
<i>Esox lucius</i>	Metanol 9% + Glicose	Dietrich <i>et al.</i> (2016)
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	DMSO 10% + NaCl 0,9%	Yang <i>et al.</i> (2017)
<i>Gymnocypris przewalskii</i>	Etilenoglicol 15% + Ringer	Wei <i>et al.</i> (2018)

Fonte: Próprio autor

## 1.4 OSMOLALIDADE

Mudanças na osmolalidade do diluente podem afetar a qualidade do sêmen do peixe após o descongelamento (JUDYCKA *et al.*, 2016), devido a grande maioria dos peixes apresentar espermatozoides imóveis no ducto testicular, e meios hiposmóticos induzem a motilidade. Isto foi comprovado para algumas espécies, como piabanha (*Brycon insignis*), em que o diluente com osmolalidades abaixo do plasma da espécie (285 mOsm/kg) ativaram os espermatozoides (SHIMODA *et al.*, 2007). Orfão *et al.* (2011) também observaram que a osmolalidade hiposmótica em relação ao plasma seminal ativaram o sêmen de *Brycon opalinus*.

Assim, devido a sensibilidade a mudanças osmóticas é recomendado para espermatozoides de peixes de água doce o uso de diluentes isotônicos ou ligeiramente hipertônicos. Este fato foi confirmado para o sêmen da piracanjuba (*Brycon orbignyanys*), onde as melhores motilidades foram observadas para os diluentes com osmolalidade de 285 e 325 mOsm/kg, que são valores mais próximos a do plasma seminal (216-275 mOsm/kg) da espécie (LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015).

Maria *et al.* (2006a) trabalharam com a mesma espécie, encontrando também maior motilidade para o diluente com osmolalidade mais próxima ao sêmen da espécie. Diluentes hipertônicos também impediram a ativação dos espermatozoides de *Brycon opalinus* antes do congelamento (VIVEIROS *et al.*, 2012). A necessidade de um meio hipertônico, para supressão da motilidade antes do congelamento também foi observada em outras espécies como *Prochilodus lineatus* (NASCIMENTO *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2013).

## 1.5 DILUIÇÃO

A taxa de diluição é a proporção de sêmen em relação a solução diluidora. Tal diluição do sêmen de peixe no diluente é de extrema importância, pois pode influenciar no resultado final do congelamento, devendo ser levado em consideração a determinação da proporção de diluição/concentração espermática. Em peixes com pequenos volumes de esperma, normalmente são utilizadas diluições maiores para poder realizar todas as análises dos parâmetros seminais (HUANG; DONG; TIERSCH, 2004). O zebrafish produz um volume seminal pequeno, e por isso foi

testado diferentes proporções de diluição (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500) no seu armazenamento refrigerado (4°C), para assim conseguir aumentar o volume e permitir o desenvolvimento de vários experimentos. No entanto, o aumento na proporção de diluição causou uma redução na porcentagem e duração da motilidade (JING *et al.*, 2009), demonstrando que a taxa de diluição afeta a motilidade após a criopreservação.

Essa influência da diluição na qualidade do sêmen após o congelamento, foi testada e confirmada por Carneiro *et al.* (2012) para o sêmen de *Colossoma macropomum*, onde os valores de motilidade e vigor espermáticos variaram de acordo com a diluição utilizada, sendo os maiores valores obtidos para a maior diluição 1:9 (sêmen/meio de congelamento). Para *Salminus brasiliensis*, a motilidade pós-congelamento, foi melhor quando utilizada uma proporção de diluição menor (1:5) (VIVEIROS *et al.*, 2009a). No entanto Zanandrea, Weingarther e Zaniboni-Filho (2016), utilizaram para a mesma espécie, uma diluição de 1:25 e 1:50 e obtiveram altos valores de fertilização (73% e 77% respectivamente), após o congelamento, demonstrando que a taxa de diluição varia entre autores e espécies.

Há ainda trabalhos que demonstram que a melhor taxa de diluição pode estar relacionada com o crioprotetor utilizado, pois para *Prochilodus lineatus* a taxa de diluição que proporcionou melhor motilidade, velocidades e morfologia espermática foi diferente entre os crioprotetores usados, sendo a proporção 1:3 e 1:6 para Metil glicol e 1:9 para DMSO (LOPES *et al.*, 2014).

## 1.6 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração espermática é a quantidade de espermatozoides por mL ou mm<sup>3</sup> no sêmen, esta quantidade varia de acordo com espécie de peixe, entre estoques, podendo também ser diferente entre indivíduos da mesma espécie (MURGAS *et al.*, 2011). Ferreira *et al.* (2001) corrobora essa ideia, pois verificou uma variação na concentração espermática de *Rhamdia quelen* de 24,6 a 138,9 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mm<sup>3</sup>. Esse fato também foi confirmado por Luz *et al.* (2001) para *Steindachneridion scripta*, que verificou uma variância de concentração de espermatozoide de 19,5 a 120,15 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mm<sup>3</sup>.

Essa variação citada acima pode estar relacionada com o período reprodutivo, temperatura, tamanho do peixe; volume seminal, alimentação e época do ano em que foi realizada a análise (SILVA *et al.*, 2009; TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2009), analisaram as características seminais do curimba (*Prochilodus lineatus*) durante os meses do período reprodutivo e verificaram um aumento da concentração espermática com o aumento da temperatura.

Na literatura pode-se encontrar a determinação da concentração espermática média para várias espécies de peixes de água doce, sendo alguns relatados na tabela abaixo.

**Tabela 2** - Concentração espermática de algumas espécies de peixes de água doce.

Espécie	Concentração espermática (sptz/mL)	Referência
<i>Rhandia quelen</i>	6,08 x10 <sup>10</sup>	Sanches <i>et al.</i> (2013)
<i>Brycon orbignyans</i>	8,2 x10 <sup>9</sup>	Murgas <i>et al.</i> (2004)
<i>Brycon orthotaenia</i>	14, 4 x10 <sup>9</sup>	Melo e Godinho (2006)
<i>Brycon cephalus</i>	9,6 x10 <sup>9</sup>	Ninhaus-Silveira <i>et al.</i> (2006)
<i>Brycon nattereri</i>	30,0 x10 <sup>9</sup>	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
<i>Leporinus obtusidens</i>	10,9 x10 <sup>9</sup>	Taitson, Chami e Godinho (2008)
<i>Prochilodus lineatus</i>	16,8; 23,4 e 27,3 x10 <sup>9</sup>	Viveiros <i>et al.</i> (2009b); Felizardo <i>et al.</i> (2010); Murgas <i>et al.</i> (2007)
<i>Salminus brasiliensis</i>	7,52, 7,58 e 6,2 x10 <sup>9</sup>	Sanches <i>et al.</i> (2011); Viveiros <i>et al.</i> (2009a)
<i>Piaractus brachypomus</i>	55,5 x10 <sup>9</sup>	Nascimento <i>et al.</i> (2010)
<i>Salmo trutta m. Fario L.</i>	16,6 x10 <sup>9</sup>	Nynca <i>et al.</i> (2014)
<i>Cyprinus carpio</i>	20,8 x10 <sup>9</sup>	Linhares <i>et al.</i> (2015)
<i>Pelteobragrus fulvidraco</i>	8,4 x10 <sup>9</sup>	Yang <i>et al.</i> (2017)
<i>Prochilodus brevis</i>	45,6 x10 <sup>9</sup>	Leite <i>et al.</i> (2018)

Fonte: Próprio autor.

A concentração de espermatozoides utilizada nas palhetas para o congelamento tem influência no resultado do processo de criopreservação. Sendo a concentração ideal variável entre as espécies, Judycka *et al.* (2018) confirmou essa influência, verificando para *Salvelinus fontinalis* em que altas concentrações de espermatozoides nas palhetas diminuíram a motilidade pós descongelamento, os autores observaram que as maiores motilidades foram obtidas com concentrações diferentes, sendo 2,0 x 10<sup>9</sup> espermatozoides (sptz)/mL para o *Salvelinus fontinalis*, 3,0 x 10<sup>9</sup> sptz/ml para *Salmo trutta m. fario* e *Salmo trutta m. trutta* e para o e *Salmo*

salar  $4,0 \times 10^9$  spz/ml, demonstrando que a concentração ideal de espermatozoides nas palhetas é espécie-específico.

### 1.7 VOLUME DAS PALHETAS

O volume das palhetas mais utilizadas em peixes são de 0,25 e 0,5 mL (FRESNEDA *et al.*, 2004; ARCINIEGAS; RODRÍGUEZ; CRUZ-CASALLAS, 2005; CIERESKO *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2008; STREIT-JR *et al.*, 2009; GALO *et al.*, 2011), sendo seu uso satisfatório para fins de pesquisa, ou quando a reprodução da espécie requer pequenas quantidades de espermatozoides. No entanto, quando a espécie é de interesse de produção comercial em larga escala, como no caso dos salmonídeos, palhetas com volumes maiores facilitam o manuseio do sêmen e reprodução da espécie (CABRITA *et al.*, 2001).

Medina-Robles, Velasco-Santamaría e Cruz-Casallas (2007) enfatizam que utilizar grandes volumes de palhetas no congelamento facilita o processo de fertilização artificial, uma vez que é requerida uma grande quantidade de sêmen para obtenção de alta fecundidade, principalmente visando a produção comercial. Estas palhetas com volumes maiores já foram utilizadas com sucesso para o congelamento do sêmen de *Oncorhynchus mykiss*, *Brycon amazonicus*, *Brycon cephalus* e *Cyprinus carpio* (CABRITA *et al.*, 2001; NINHAUS-SILVEIRA *et al.* 2002, 2006, HORVÁTH *et al.*, 2007; MEDINA-ROBLES, VELASCO-SANTAMARÍA; CRUZ-CASALLAS, 2007)

Para outra espécie de grande interesse econômico, como o bagre africano (*Clarias gariepinus*), a utilização de volumes menores de palhetas foi melhor, pois resultaram em maiores taxas de fertilização e eclosão (MISKOLCZI *et al.*, 2005).

### 1.8 INTEGRIDADE DE DNA

A preservação da integridade do DNA é fundamental para obter uma qualidade espermática, sendo por isso considerada um dos indicadores de potencial de fertilidade (CIERESZKO; WOLFE; DABROWSKI, 2005). Sendo nos últimos anos utilizada como uma ferramenta auxiliar para avaliar o processo de criopreservação de sêmen de peixes. Isto porque alterações ocorridas no DNA de espermatozoides

durante o processo de criopreservação, podem ocasionar danos na prole (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2009).

Um dos métodos utilizados para análise da DNA é o ensaio Cometa (também chamado de eletroforese em gel unicelular) que é um teste sensível, simples e rápido que avalia a fragmentação do DNA em células individuais (DIETRICH, *et al.*, 2005). Assim as células com DNA fragmentado exibem uma migração do DNA em direção ao ânodo, que dependendo do tamanho da fragmentação se assemelham a um cometa. Esta fragmentação é mensurada de acordo com seu comprimento e grau de intensidade (CABRITA *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos mostraram que o processo de congelamento/descongelamento pode resultar em danos no DNA, mesmo que seja pequena essa fragmentação, como por exemplo em *Oncorhynchus mykiss* (LABBE *et al.* 2001), *Dicentrarchus labrax* (ZILLI *et al.*, 2003) e *Sparus aurata* (CABRITA *et al.*, 2005).

## 1.9 MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE PEIXES

A motilidade espermática é a quantidade de espermatozoides móveis, sendo o parâmetro mais utilizado para determinar a qualidade seminal das espécies de peixes após o congelamento (CABRITA *et al.*, 2010). Além disso o tempo de duração dessa motilidade é importante para que ocorra a fertilização, sendo que em teleósteos essa motilidade dura cerca de um minuto (LEUNG; JAMIESON, 1991 citado de MELO; GODINHO, 2006).

Esta motilidade pode ser medida subjetivamente, por observação direta da lâmina no microscópio, onde é estabelecida uma escala arbitrária de mobilidade de espermatozoide de 0 a 5, onde 0 significa nenhum espermatozoide se movendo, e 5 mais de 80% de mobilidade (NINHAUS-SILVEIRA, *et al.*, 2006).

Ou pode ser mensurada através de programas, como por exemplo o Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) que é um sistema automático, usado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas da trajetória do espermatozoide, gerando informações sobre motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP), amplitude de deslocamento lateral

da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e linearidade (LIN) (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014).

O CASA<sup>®</sup> tem sido cada vez mais usado para avaliar a motilidade dos espermatozoides de peixes, pois fornece informações mais apuradas, precisas e objetivas sobre o movimento das células (VIEIRA, 2010). Pode-se destacar os trabalhos que utilizaram o CASA, para análise seminal de espécies de água doce (SHIMODA, 2004; CIERESZKO *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2010; VIVEIROS *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2011b; BASHIYO-SILVA, 2014; CIERESZKO *et al.*, 2014; VIVEIROS *et al.*, 2015; BERNÁTH *et al.*, 2016; DIETRICH *et al.*, 2016; PINHEIRO *et al.*, 2016; GALLEGO *et al.*, 2017; LIU; GRIER; TIERSCH, 2018; LUJIĆ *et al.*, 2017).

#### 1.10 *Astyanax altiparanae* (GARUTTI E BRITSKI, 2000)

*Astyanax altiparanae* (Figura 1) conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, pertence à família Characidae, subfamília Tetragonopterinae, é uma espécie nativa da bacia do alto Paraná, de pequeno porte, rápido crescimento e habito alimentar onívoro (SABBAG *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012).

**Figura 1** - *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (2000), exemplar com comprimento total de 10 cm



Fonte: Próprio autor

Além disso é uma espécie oportunista com fácil adaptação a diferentes ambientes, desova mais de uma vez ao ano, podendo ter sua reprodução induzida em laboratório, tendo grande fecundidade e alta taxa de crescimento (SABBAG *et al.*, 2011). Apresentam dimorfismo sexual, onde as fêmeas são maiores e os machos

possuem espículas na nadadeira anal durante o período reprodutivo, o que facilita sua identificação (GARUTTI, 2003).

É uma espécie muito utilizada como isca na pesca esportiva, além de ser bem aceita como petisco, apresentando assim grande potencial comercial. Tendo em vistas as características apresentadas, esta espécie tem sido muito utilizada na aquicultura, que é uma indústria que está em crescente crescimento no mundo. Só no Brasil a aquicultura produziu 547,163 mil toneladas em 2017, deixando o país entre os vinte e cinco principais produtores mundiais (IBGE, 2017). O estado de São Paulo produziu cerca de 132 toneladas de lambari no ano de 2017, sendo o segundo maior produtor de lambari do país (IBGE, 2017). Devido sua importância biológica e econômica, diversos trabalhos já foram realizados objetivando conhecer a biologia de *Astyanax altiparanae* (BEM *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Considerando a importância econômica e biológica de *Astyanax altiparanae* tem-se por objetivo determinar as características seminais da espécie e desenvolver um protocolo que possibilite a criopreservação espermática da espécie.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) avaliar as características seminais de *Astyanax altiparanae* no que se refere a motilidade espermática, tempo da motilidade, coloração e osmolalidade;
- b) identificar as soluções diluidoras que mantenham após a diluição as características do material seminal, tanto diluído como congelado;
- c) avaliar as possíveis alterações no DNA dos espermatozoides, pelo uso do Teste de Ensaio Cometa, após aplicação dos protocolos para criopreservação e descongelamento;
- d) definir um protocolo de criopreservação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizados exemplares adultos e maduros de *Astyanax altiparanae*, do plantel pertencente ao Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira.

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 110 peixes que foram colocados aleatoriamente em um tanque circular de PVC de 5 mil litros, ao todo foram colocados 75 machos e 35 fêmeas, resultando na proporção 2:1 (macho/fêmea). Os machos tinham comprimento total médio de 10,4 cm, comprimento padrão de 8,6 cm e peso médio de 16 gramas. Foram medidos os parâmetros de qualidade de água, com média de temperatura de 27,7 °C, pH de 7,6 e amônia de 0,00 ppm. No período de realização da coleta de sêmen, os machos foram transferidos para cinco caixas de polipropileno de 180 litros, cada uma com oitos peixes, para facilitar o manuseio. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Engenharia da Unesp, Campus de Ilha Solteira, no processo CEUA-FEIS/UNESP 05/2017.

#### 3.2 INDUÇÃO HORMONAL

Utilizou-se o Ovopel<sup>®</sup> (Interfish, Hungria) que é composto por GnRH $\alpha$  associada ao um inibidor de dopamina, o metoclopramida (D-Ala6, Pro9 Net-mGnRH). Para isso foi utilizado uma dosagem única de Ovopel<sup>®</sup> na concentração de 3 mg/kg de peixe vivo (YASUI *et al.*, 2014).

#### 3.3 COLETA DO SÊMEN

Após 226 horas/graus do momento da indução, os peixes foram anestesiados com uma solução de benzocaína (Sigma – Aldrich E1501) (100mg/L). Após a anestesia, foi realizada a coleta do sêmen por meio de massagem abdominal sentido antero-posterior do corpo, para coleta utilizou-se micropipetas de 10 - 100  $\mu$ l, as amostras foram colocadas em tubos Eppendorf esterilizados e, previamente

identificados. De cada amostra foi realizada a análise dos parâmetros seminais, quanto à motilidade, duração da motilidade, osmolalidade e concentração espermática.

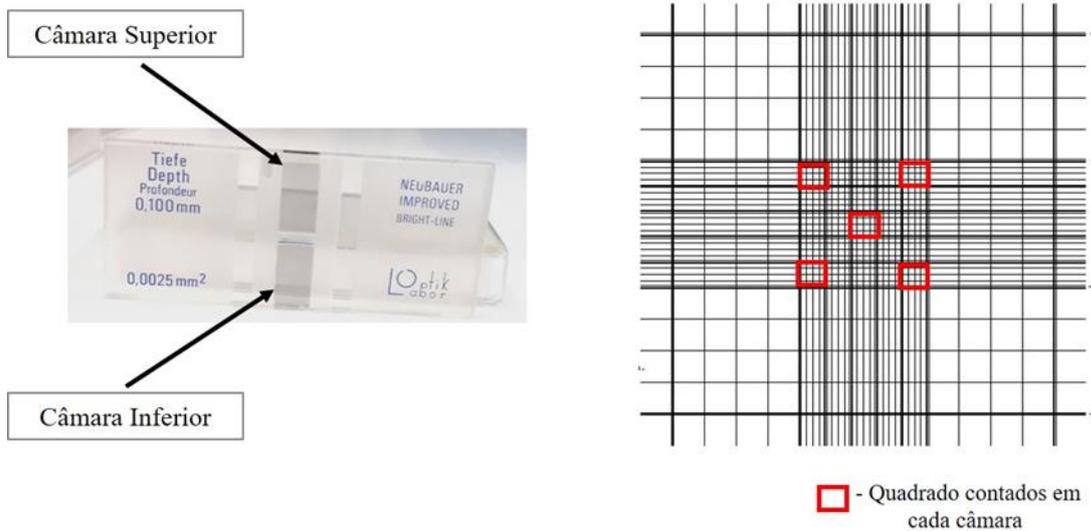
### **3.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS**

#### **3.4.1 Sêmen fresco**

A coloração foi estimada considerando os padrões translucido branco, viscoso. A análise espermática subjetiva foi estipulada pela porcentagem de espermatozoides em movimento. Para isso 1µl de sêmen foi colocado em uma lâmina histológica e ativada com água destilada na proporção 1:10 (sêmen:água). A duração da motilidade foi estimada em segundos, desde a ativação dos espermatozoides até a observação de 10% dos espermatozoides móveis. A motilidade espermática também foi mensurada utilizando o sistema computadorizado ISAS® CASA Integrated Semen Analysis System D4C20, para a análise da motilidade e tempo de duração foram utilizados seis peixes.

Para a osmolalidade o sêmen de três peixes foram centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos, posteriormente foram colocados 50 µl do sobrenadante em tubos de eppendorf e analisado no osmômetro (OSMOMAT® model 030, Berlim, Alemanha). A concentração espermática (espermatozoides/mL), foi mensurada utilizando a câmara hematimétrica tipo Neubauer, para isso o sêmen foi diluído em solução de formol-salina na proporção de 1:1000. Foram contabilizados cinco quadrados da câmara superior e inferior (Figura 2), sendo utilizados vinte peixes com três repetições por peixe (BASHIYO-SILVA *et al.*, 2015).

**Figura 2** - Delineamento da contagem de espermatozoides para determinação da concentração espermática

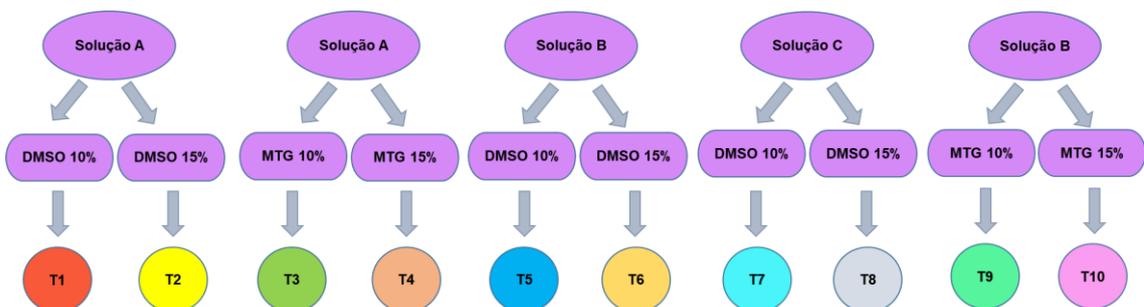


Fonte: Próprio Autor

### 3.4.2 Soluções crioprotetoras

Foram utilizadas três soluções diluentes: A - composta por 5% de glicose + 10% gema de ovo com 10 ou 15% de crioprotetor interno; B - constituída por 5% de Bestvile Thawing Solution - BTS®, (composição: glicose 79,9%, citrato de sódio 12,7%, EDTA 2,7%, bicarbonato de sódio 2,7% e cloreto de potássio 1,6% e sulfato de gentamicina 250µg/mL) (Minitub, Tiefenbach, Alemanha), e C – composta apenas por glicose 5%, com 10 ou 15% de crioprotetores internos, sendo utilizados dois crioprotetores internos, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metilglicol (MTG) (Sigma – Aldrich) resultando em dez tratamentos (Figura 3).

**Figura 3** - Soluções crioprotetoras utilizadas, nos dez tratamentos



Fonte: Próprio Autor

### 3.4.3 Teste de toxicidade

Anteriormente ao processo de congelamento foi realizado o teste de toxicidade das soluções crioprotetoras, para isso 0,5 µl de sêmen de *A. altiparanae* foi diluído na proporção 1:25 (sêmen:solução), misturado e homogeneizado em cada um dos dez tratamentos, além das soluções diluidoras A (5% de glicose + 10% gema de ovo) B (5% de Bestvile Thawing Solution - BTS®) e (5% glicose), posteriormente o sêmen foi colocado em uma câmara de Makler e ativado com água destilada, e realizada a análise através do programa de análise espermática (ISAS® CASA). Todo esse procedimento foi realizado em um período de aproximadamente 15 minutos. Foi realizado quatro repetições para cada solução. Também foi medido a osmolalidade das soluções A, B e C e dos dez tratamentos. Foram analisadas a motilidade total (MT) motilidade progressiva (MP) e as velocidades espermáticas: velocidade curvilínea (VCL, µm/s); velocidade linear (VSL, µm/s); velocidade média (VAP, µm/s). Coeficiente de linearidade (LIN, %; calculado como VSL/VAP); coeficiente de retilinearidade (STR, %; calculado como VSL/VCL); oscilação média da trajetória espacial do espermatozoide, oscilação, WOB (%); amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH, µm); frequência de batimento flagelar (BCF, Hz). Espermatozoides com VCL < 10 µm/s foram considerados imóveis.

### 3.4.4 Congelamento

O sêmen foi diluído utilizando oito soluções crioprotetoras (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8) selecionadas no teste toxicidade, na proporção 1:25 (sêmen:solução), foi envasado em palhetas de plástico de 0,25 mL (Minitub) a temperatura ambiente de 28 °C, após um período de equilíbrio de aproximadamente 15 minutos as palhetas foram colocadas em uma bandeja de tela de aço e disposta cerca de 1 cm de distância da superfície do nitrogênio líquido, (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006) contido em uma caixa isolante de isopor® de 33 litros (33,9 cm altura x 26 cm largura x 41 cm comprimento), com temperatura ambiente de -195°C por 7 minutos, logo após as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para um “container” criogênico do tipo “líquido” (ABS - Pecplan, modelo ABS20 - MVE).

### 3.4.5 Pós-descongelamento

Após um mês, as amostras foram descongeladas em banho maria a 36°C por 7 segundos, e foram medidas a motilidade total (%) e as velocidades espermáticas do sêmen pós-descongelados, por meio do sistema integrado ISAS® CASA Integrated Semen Analysis System D4C20.

### 3.5 INTEGRIDADE DE DNA

A integridade de DNA foi avaliada através do ensaio cometa de acordo com o protocolo proposto por Singh *et al.* (1988) e Klaude *et al.* (1996) com modificações. Para a avaliação foram utilizados três peixes por tratamentos. Lâminas foram preparadas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal / *Normal Melting agarose* (NMP), para isso as lâminas foram mergulhas na agarose, retirado o excesso, deixadas para secar e depois guardadas na geladeira.

Após foi adicionado em um microtubo 10 µl de sêmen diluído e 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão / *Low Melting Temperature Agarose* (LMP), depois foram colocadas três gotas desta solução sobre as lâminas previamente preparadas com agarose normal, em seguida cobriu-se com uma lamínula e foram levadas para a geladeira por cerca de trinta minutos para solidificar a agarose *Low Melting*. Após esse período foram removidas as lamínulas e as lâminas acondicionadas em uma cuba de vidro, cobertas com a solução de lise pH 10 (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Lauril 35mM), e mantidas imersas por no mínimo uma hora a 4°C.

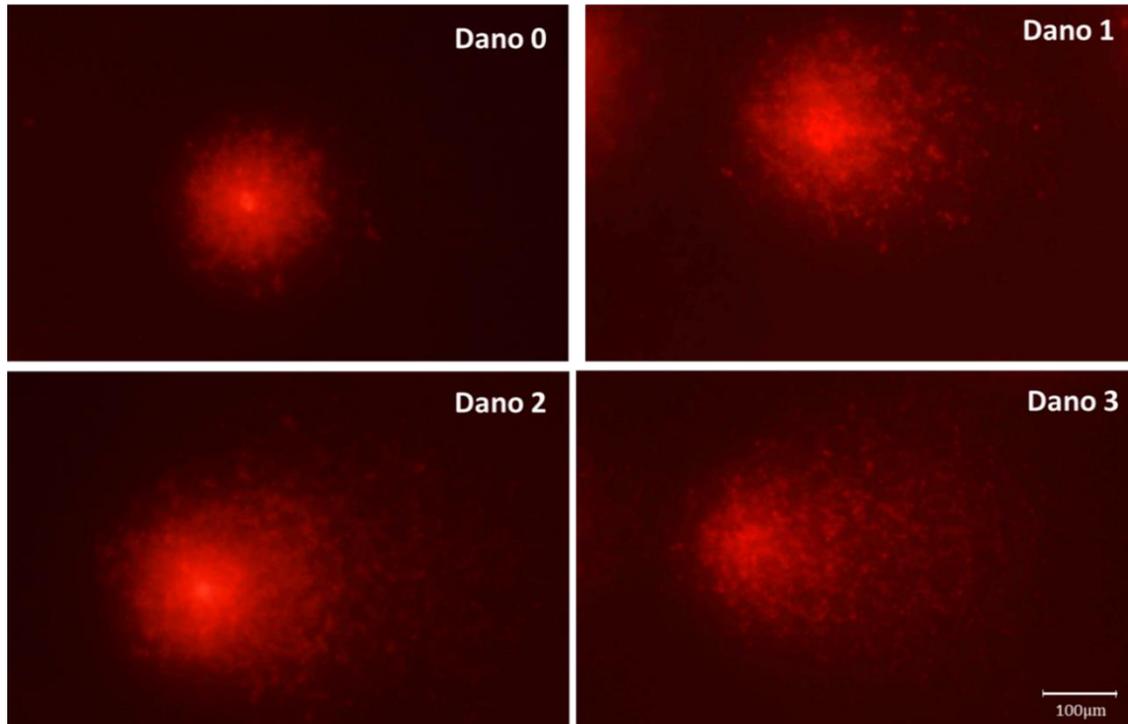
Posteriormente as lâminas foram acomodadas em uma cuba de eletroforese e preenchidas com solução de eletroforese pH 13 (EDTA 200mM, NaOH 10N), mantidas por trinta minutos a 4°C, em seguida foi realizada a eletroforese por vinte minutos a 25V e 300mA. Após esse processo as lâminas foram cobertas com solução de neutralização pH 7,5 (Tris 0,4M), por cinco minutos (3x) e então foram secas e fixadas, por imersão em etanol absoluto gelado por cinco minutos e secas novamente.

Em seguidas as lâminas foram coradas, adicionando 100 µl de solução de Brometo de etídio sobre cada lâmina, cobertas com lamínulas e analisadas em objetiva de 40x com auxílio de um microscópio de fluorescência. Foram contadas 100 células por amostra. As células foram classificadas em uma classe de dano que foi determinada de acordo com intensidade e tamanho da cauda (KOBAYASHI, 1995), sendo classe 0 – sem dano aparente, e 1 – 3 representando os danos crescentes do DNA, ou seja, o comprimento da cauda e intensidade (Figura 5).

O índice de danos (ID total) foi mensurado pela fórmula abaixo, onde n representa o número de células de cada classe de dano:

$$ID = 0. (n \text{ Classe } 0) + 1. (n \text{ Classe } 1) + 2. (n \text{ Classe } 2) + 3. (n \text{ Classe } 3).$$

**Figura 5.** Fotomicrografia de fluorescência (aumento 100 X) de núcleos com diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa, sendo o dano 0 – sem dano aparente, dano 1 – pouco dano, dano 2 – dano médio e dano 3 – dano grande.



Fonte: Próprio Autor.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os peixes foram considerados como repetição. A análise estatística foi realizada seguindo o modelo de parcela subdividida, através da análise de variância (ANOVA) nos resultados com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi aplicado o teste de Tukey para comparação do controle e os tratamentos, e para verificar a diferença entre os tratamentos foi aplicado o teste de Scott-Knott a um nível de significância de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados no programa estatístico Sisvar.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS SEMINAIS

O sêmen fresco de *Astyanax altiparanae* apresentou-se translúcido, com consistência pouco viscosa. A média dos valores para osmolalidade do plasma seminal foi de  $219 \pm 0,03$  mOsm/kg, a concentração espermática média foi de  $7,22 \pm 3,2 \times 10^9$  espermatozoides/mL e volume seminal de 30  $\mu$ L. A motilidade subjetiva média foi de 65%, com uma duração de motilidade média de  $33 \pm 2,2$  segundos (Tabela 3). Os resultados médios obtidos pela análise do sêmen fresco utilizando o programa de análise espermática computadorizada foram: motilidade total  $79,72 \pm 7,6\%$  e motilidade progressiva de  $54,10 \pm 8,8$ . Foi detectada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para o parâmetro motilidade espermática, entre os valores obtidos pelo método subjetivo (65%) e pelo uso do CASA (79,72%), sendo que os valores obtidos pelo método eletrônico foram significativamente melhores.

Para as velocidades e movimentos específicos analisados pelo CASA, os valores médios encontrados foram: VCL com  $47,28 \pm 15,8$   $\mu$ m/s, VSL  $35,77 \pm 12,4$   $\mu$ m/s e VAP com  $43,37 \pm 15$   $\mu$ m/s, LIN  $75,5 \pm 6,1\%$ , STR  $82,6 \pm 4,3\%$ , WOB  $91,2 \pm 2,9\%$ , ALH  $1,3 \pm 0,1$   $\mu$ m e BCF  $6,9 \pm 0,3$  Hz.

### 4.2 TESTE DE TOXICIDADE

A medição da osmolalidade das soluções utilizadas para o teste de toxicidade (Tabela 4), mostrou que as soluções utilizadas eram hiperosmóticas em comparação com o plasma seminal da espécie, também foi verificado que para algumas soluções que continham o crioprotetor interno, não foi possível realizar a medição da osmolalidade provavelmente porque a adição do crioprotetor aumentou a osmolalidade acima da capacidade do equipamento que é 3000 mOsmol/kg.

**Tabela 4** - Osmolalidade das soluções utilizadas no teste de toxicidade.

<b>Solução</b>	<b>Composição</b>	<b>Osmolalidade (mOsm/kg)</b>
<b>A</b>	Gema de ovo 10% + Glicose 5%	339
<b>B</b>	BTS 5%	347
<b>C</b>	Glicose 5%	318
<b>T1</b>	Gema + Glicose + DMSO 10%	2.766
<b>T2</b>	Gema + Glicose + DMSO 15%	-
<b>T3</b>	Gema + Glicose + MTG 10%	2.531
<b>T4</b>	Gema + Glicose + MTG 15%	-
<b>T5</b>	BTS 5% + DMSO 10%	2.529
<b>T6</b>	BTS 5% + DMSO 15%	-
<b>T7</b>	Glicose 5% + DMSO 10%	2.226
<b>T8</b>	Glicose 5% + DMSO 15%	-
<b>T9</b>	BTS 5% + MTG 10%	2.343
<b>T10</b>	BTS 5% + MTG 15%	-

Fonte: Própria autor.

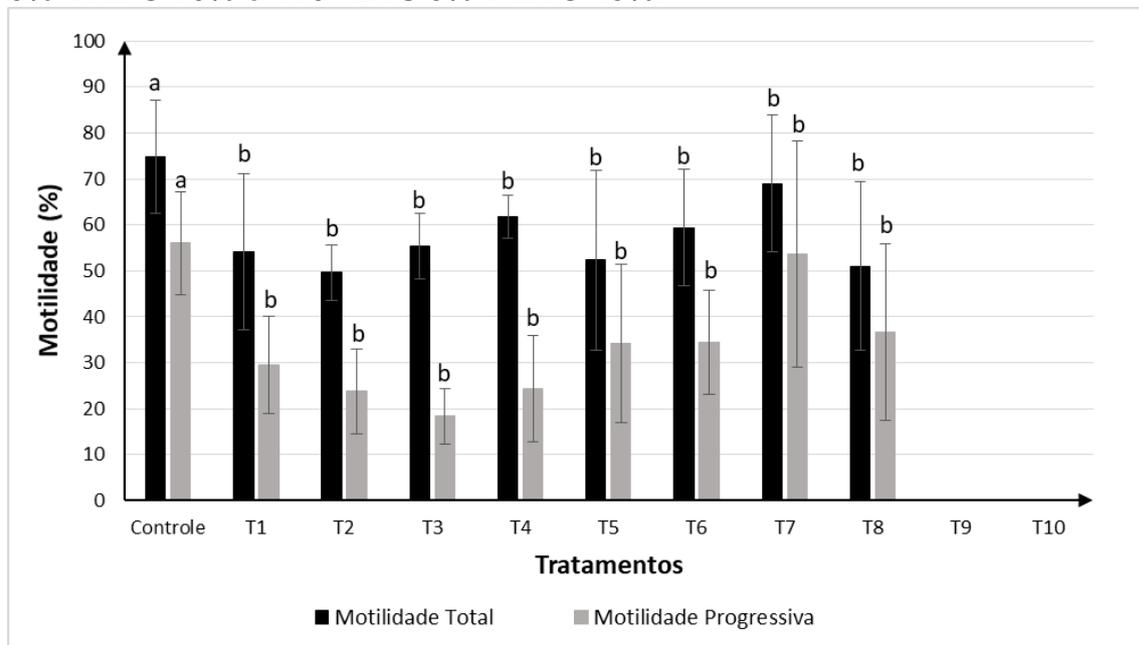
Verificou-se que as soluções diluentes A, B e C sem adição do crioprotetor ativaram os espermatozoides e que, os tratamentos T9 (BTS 5% + 10% de metil glicol e T10 (BTS 5% + metil glicol 15%) foram tóxicas para a espécie, pois ao tentar ativar o sêmen diluído nestes tratamentos, não foi observada motilidade espermática.

Foi observada uma diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle, no entanto na comparação entre apenas os tratamentos não observada diferença estatística. Todos os outros tratamentos, com exceção do tratamento T2, tiveram motilidade total (MT) pós diluição acima de 50%, sendo que os maiores valores foram proporcionados pelos seguintes diluentes: T7 (Glicose 5% + DMSO

10%), T4 (Gema de ovo 10% + Glicose 5% + MTG15%) e T6 (BTS5% + DMSO15%) com  $68,95 \pm 14,8\%$ ,  $61,77 \pm 4,6\%$ ,  $59,42 \pm 12,7\%$ , respectivamente.

Já em relação a motilidade progressiva (MP), as maiores médias foram obtidas para os tratamentos T7 ( $53,70 \pm 24,7\%$ ), T8 ( $36,7 \pm 19,2\%$ ) e T6 ( $34,40 \pm 11,2\%$ ). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os oito tratamentos quanto aos parâmetros, MP (Figura 7).

**Figura 7** - Porcentagem da motilidade total e motilidade progressiva para o teste de toxicidade. T1 - Gema de ovo 10% + Glicose 5% + DMSO10%, T2 - Gema de ovo 10% + Glicose 5% + DMSO15%, T3 - Gema de ovo 10% + Glicose 5% + MTG010%, T4 - Gema de ovo 10% + Glicose 5% + MTG15%, T5 - BTS5% + DMSO10%, T6 - BTS5% + DMSO15%, T7 - Glicose 5% + DMSO10%, T8 - Glicose 5% + DMSO15%, T9 - BTS 5% + MTG 10% e T10 - BTS 5% + MTG 15%.



Nota: As letras minúsculas mostram as diferenças estatísticas entre o controle e os tratamentos pelo teste de Tukey. E não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Própria autora.

Para os parâmetros quanto a velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP) foi verificada uma diferença significativa entre o controle e os tratamentos (Figura 8).

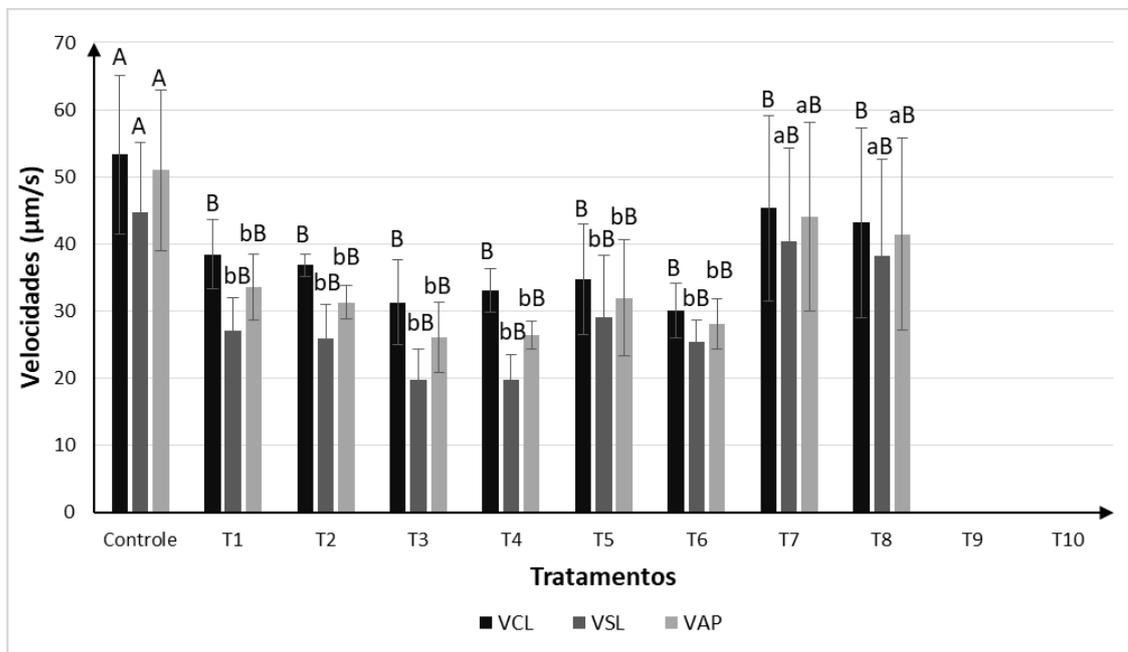
Com relação a velocidade curvilínea (VCL) não foi observada diferença significativas entre os tratamentos, no entanto pode-se destacar que, T7 apresentou o maior valor com  $45,3 \pm 13,7 \mu\text{m/s}$ , seguido por T8 ( $43,15 \pm 14,1 \mu\text{m/s}$ ) e T1 ( $38,45 \pm 5,2$

$\mu\text{m/s}$ ). E os menores valores foram observados nos tratamentos T3 ( $31,25\pm 6,3 \mu\text{m/s}$ ) e T6 ( $30,02\pm 4,0 \mu\text{m/s}$ ) (Figura 8).

Para velocidade em linha reta (VSL) T7 e T8 tiveram os maiores valores com  $43,15\pm 14,3 \mu\text{m/s}$  e  $40,35\pm 13,9 \mu\text{m/s}$  respectivamente, sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Os menores valores encontrados  $19,80\pm 4,5 \mu\text{m/s}$  e  $19,67\pm 3,8 \mu\text{m/s}$  foram para os tratamentos T3 e T4, no entanto estes não diferiram estatisticamente de T1, T2, T5 e T6.

Assim como o observado para o VSL, no parâmetro velocidade média da trajetória (VAP) os maiores valores foram observados nos tratamentos T7 ( $44,05\pm 14,0 \mu\text{m/s}$ ) e T8 ( $41,40\pm 14,1 \mu\text{m/s}$ ) sendo também estatisticamente iguais entre si. Já os menores os valores foram para os tratamentos T3 e T4 com  $26,05\pm 5,2 \mu\text{m/s}$  e  $26,40\pm 2,0 \mu\text{m/s}$  respectivamente, no entanto estes só diferiram estatisticamente dos tratamentos T7 e T8 (Figura 8).

**Figura 8.** Velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP) para o teste de toxicidade. Colunas com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o controle e os tratamentos pelo teste de Tukey.



Fonte: Própria autora.

**Nota:** E as colunas com letras minúsculas diferentes mostram a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste Scott-Knott.

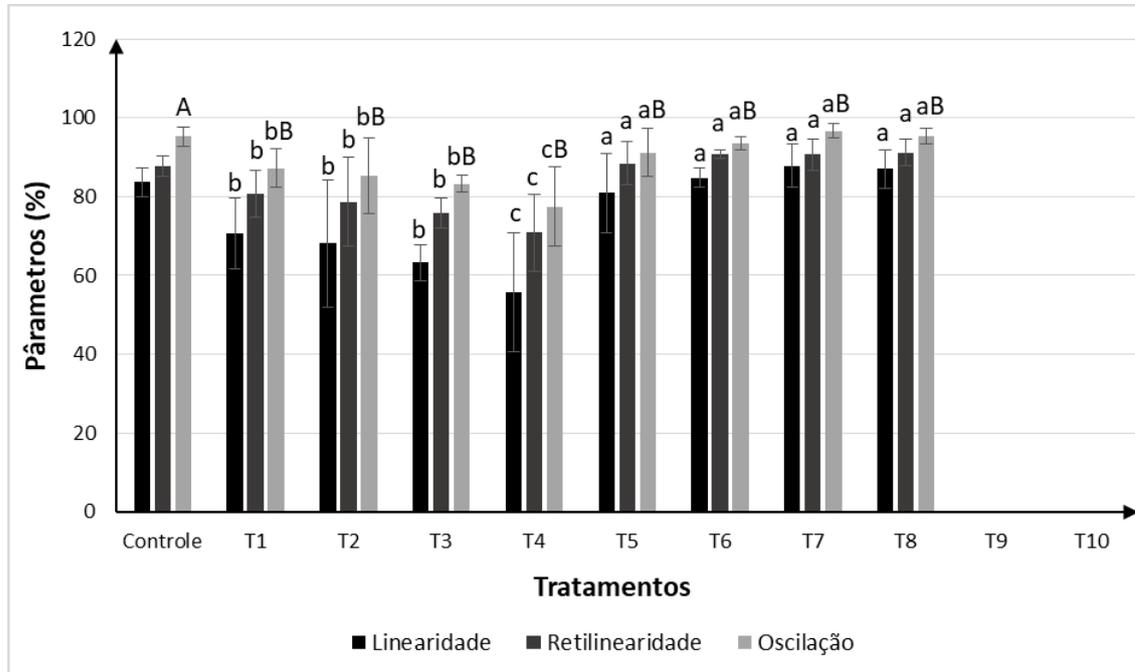
Quanto ao parâmetro LIN, não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos. Os maiores valores para este parâmetro foram encontrados

nos tratamentos T5 ( $80,92\pm 10,1\%$ ), T6 ( $84,82\pm 2,5\%$ ), T7 ( $87,82\pm 5,4\%$ ) e T8 ( $87,05\pm 4,9\%$ ), sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos. O tratamento T4 foi o responsável pelo menor valor ( $55,73\pm 15,0\%$ ) diferindo de todos os outros tratamentos (Figura 9).

Para a STR os tratamentos T5 ( $88,42\pm 5,4\%$ ) T6 ( $90,70\pm 1,0\%$ ) T7 ( $90,70\pm 4,0\%$ ) e T8 ( $91,22\pm 3,3\%$ ) tiveram as maiores porcentagens e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Quanto ao parâmetro WOB, houve diferença estatística entre o controle e os tratamentos.

Os tratamentos com maior percentual de STR foram T5 ( $91,26\pm 5,9\%$ ) T6 ( $93,50\pm 1,7\%$ ) T7 ( $96,75\pm 1,8\%$ ) e T8 ( $95,37\pm 2,0\%$ ), sendo semelhantes estatisticamente entre si, mas diferindo dos demais tratamentos. A menor porcentagem para WOB foi observada no tratamento T4 ( $77,53\pm 10,0\%$ ) que diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos (Figura 9)

**Figura 9** - Parâmetros linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB) para o teste de toxicidade. As letras maiúsculas nas colunas mostram a diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o controle e os tratamentos pelo teste Tukey.



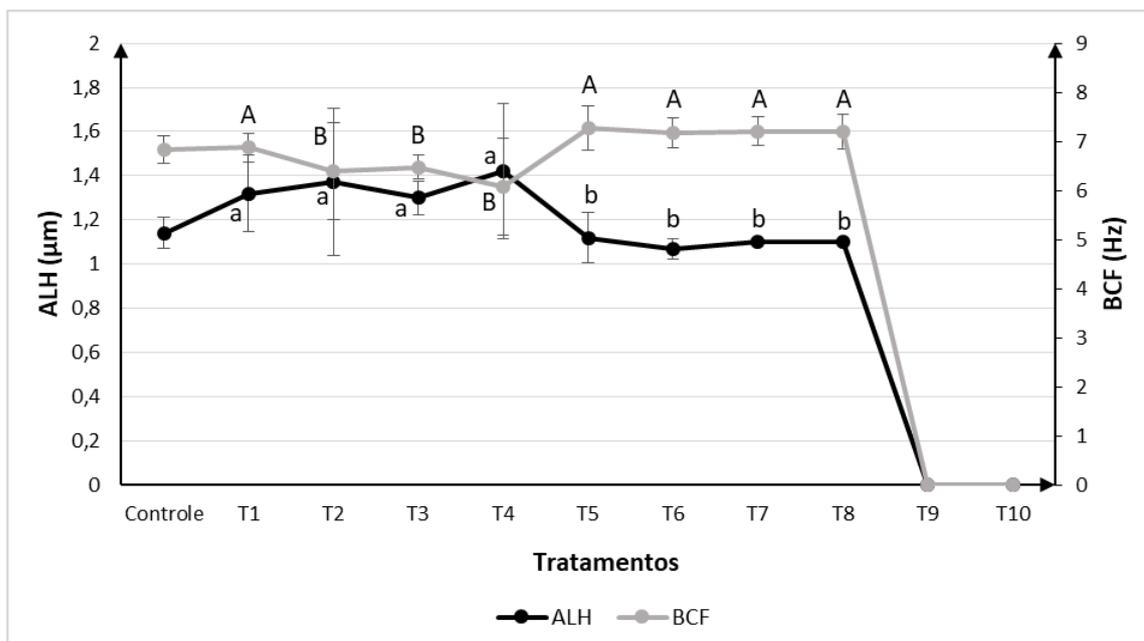
Nota: E as letras minúsculas na colunas mostram a diferença significativa ( $p < 0.05$ ) de cada parâmetro entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Própria autora.

Para a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), os tratamentos T1 apresentou média de  $1,32\pm 0,17\mu\text{m}$ , T2  $1,37\pm 0,33\mu\text{m}$ , T3  $1,30\pm 0,07\mu\text{m}$  e T4

1,42±0,30µm, sendo estatisticamente diferentes de T5, T6, T7 e T8. Em relação ao parâmetro frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), T1, T5, T6, T7 e T8 obtiveram médias de 6,87±0,29 Hz, 7,27±0,44 Hz, 7,17±0,30 Hz, 7,20±0,29 Hz e 7,20±0,34 Hz, sendo significativamente iguais entre si. T4 teve a menor média com 6,07±0,99 Hz, porém este não apresentou diferença estatística em comparação com T2 e T3 (Figura 10).

**Figura 10** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF - Hz) para o teste de toxicidade. As letras minúsculas mostram a diferença significativa ( $p < 0.05$ ) para ALH entre os tratamentos, e as letras maiúsculas mostram a diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos para o parâmetro BCF pelo teste Scott-Knott. Não foi observada diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre o controle e os tratamentos pelo teste de Tukey.



Fonte: Própria autora.

#### 4.3 DESCONGELAMENTO DO SÊMEN

Após o descongelamento do sêmen não foi observado nenhuma motilidade em nenhum dos oitos tratamentos utilizado para o congelamento.

#### 4.4 INTEGRIDADE DE DNA

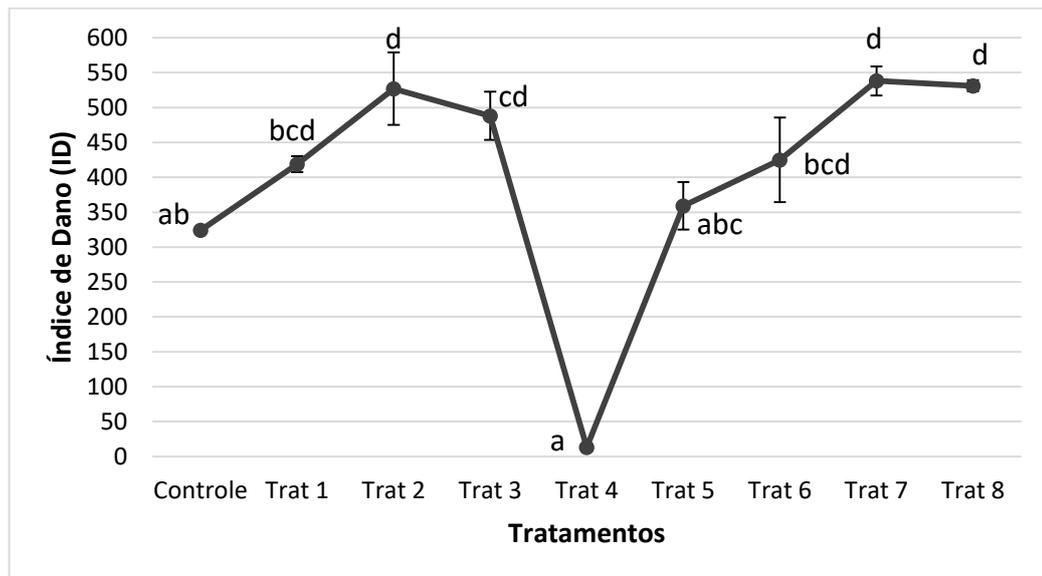
A análise estatística demonstrou que não houve diferença estatística entre o controle e os tratamentos T4 (Gema de ovo 10% + Glicose 5% + MTG15%) e T5 (BTS5% + DMSO10%) quanto a integridade do DNA, sendo que o tratamento T4 apresentou o menor índice de dano (ID) ( $13 \pm 4,9$ ). No entanto este baixo índice encontrado no tratamento T4, possivelmente se deve à que, os componentes químicos deste tratamento provocaram a compactação do núcleo dos espermatozoides (Figura 11), não permitindo a exposição do DNA nuclear e, conseqüentemente, uma avaliação se houve ou não danificação deste. Os tratamentos T5 e T6 também não diferiram do controle. Os maiores ID foram encontrados nos tratamentos T2 ( $527 \pm 51,8$ ), T7 ( $538 \pm 20,8$ ) e T8 ( $531 \pm 7,9$ ), estando ainda estatisticamente iguais (Figura 12).

**Figura 11** - Núcleos compactados encontrados no T4 – Gema de ovo 10% + Glicose 5% + MTG15%.



Fonte: Próprio Autor

**Figura 12.** Índice de danos gerados ao DNA pelo processo de criopreservação do sêmen de *Astyanax altiparanae*. Controle – sêmen fresco, T1 - Gema de ovo 10% + Glicose 5% + DMSO10%, T2 - Gema de ovo10% + Glicose 5% + DMSO15%, T3 - Gema de ovo 10% + Glicose 5% + MTG010%, T4 – Gema de ovo10% + Glicose 5% + MTG15%, T5 – BTS5% + DMSO10%, T6 – BTS5% + DMSO15%, T7 – Glicose 5% + DMSO10% e T8 – Glicose 5% + DMSO15%. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ), pelo teste de Kruskal-Wallis.



Fonte: Próprio Autor.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS SEMINAIS

Os resultados obtidos para o parâmetro seminal de osmolalidade (219 mOsm/kg) está próxima da osmolalidade encontrada em outros Characiformes, que varia de 249 mOsm/kg em *Brycon orbignyianus* (LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015) a 313 mOsm/kg em *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

A média da concentração espermática encontrada neste trabalho para *A. altiparanae* ( $7,22 \pm 3,1 \times 10^9$  sptz/mL), foi superior à obtida para a mesma espécie por outros autores como: Yasui *et al.* (2014), que encontrou  $6,3 \times 10^8$  sptz/mL, Nascimento (2015) que obteve  $6,7 \times 10^8$  sptz/mL e Zimba *et al.* (2017) que contou  $4,9 \times 10^8$  sptz/mL.

O período de duração da motilidade observada neste trabalho para *A. altiparanae* ( $33 \pm 2,2$ s) foi inferior ao encontrado por Nascimento (2015) de cerca de 90 segundos e Yasui *et al.* (2014) de 86,5 segundos para a mesma espécie. Apesar do baixo tempo de duração da motilidade obtido neste trabalho, este dado está dentro rol dos períodos encontrados para maioria dos teleósteos que é <1 min (MELO; GODINHO, 2006). Sendo que a duração da motilidade, está diretamente relacionado com a capacidade de fertilização, uma vez que o espermatozoide necessita encontrar a micrópila do oócito para realizar a fecundação (TIBA *et al.*, 2009).

A análise através do ISAS® CASA informou uma maior motilidade total do sêmen fresco, quando comparada a análise subjetiva, o que está relacionado, provavelmente a acurácia do processo eletrônico. Além disso, a utilização do programa computadorizado, diminui o tempo gasto na observação dos espermatozoides, evitando as diferenças entre observadores resultando em dados mais precisos (LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015).

Enquanto que para o método subjetivo a precisão é dependente da experiência do observador, e também não permite avaliar outros tipos de comportamento cinético dos espermatozoides (NEUMANN *et al.*, 2017). Apesar disso há também trabalhos realizados com outros Characiformes como, *Piaractus brachypomus* e *Prochilodus lineatus*, em que a utilização dos dois métodos não influenciaram nos resultados obtidos para motilidade, não sendo observada diferença estatística entre os dois métodos (NASCIMENTO *et al.*, 2010; VIVEIROS *et al.*, 2010).

A motilidade progressiva foi menor em relação a encontradas por Nascimento (2015), que obteve aproximadamente 70% e 15%, e Yasui *et al.* (2014) que encontrou 79,5 %, para mesma espécie estudada neste trabalho. O que pode estar relacionado ao método de avaliação e a características fisiológicas das populações avaliadas.

## 5.2 TESTE DE TOXICIDADE

Os tratamentos que obtiveram melhores resultados para o parâmetro de motilidade total relativa para sêmen de *A. altiparanae* foram T4, T6 e T7, sendo estes resultados importantes para o processo de criopreservação, pois é necessária ter uma motilidade total alta após a diluição do sêmen nos crioprotetores, uma vez que após o processo de congelamento normalmente ocorre uma redução desta motilidade.

A alta motilidade do sêmen observada com a utilização de um diluidor simples como DMSO + glicose (T7) corrobora com os trabalhos de congelamento já realizados para outras espécies como *Salminus brasiliensis* (VIVEIROS *et al.*, 2009a) e *Epinephelus akaara* (AHN *et al.*, 2018). Assim como a proteção obtida utilizando DMSO + BTS (T6) também já foi observada para *Prochilodus lineatus* (MURGAS *et al.*, 2007; VIVEIROS *et al.*, 2009b) e *Salminus brasilienses* (VIVEIROS *et al.*, 2009a), e a utilização de um diluidor com a utilização Metilglicol + gema de ovo + glicose (T4) também já foi relatada para o sêmen de *Colossoma macropomum* (CARNEIRO *et al.*, 2012)

Os tratamentos com BTS e Metilglicol a 10% e 15% (T9 e T10) foi considerado tóxico para o sêmen de *A. altiparanae*, pois não foi observada motilidade durante o teste de toxicidade, resultado diferente do obtido por Bashio-Silva (2014) para *Brycon amazonicus*, que após a diluição nos mesmos crioprotetores obteve motilidade de 61-80% para BTS + MTG 15% e 81-100% BTS + MTG10%. A mesma solução também foi utilizada com sucesso para o congelamento de sêmen de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus* (VIVEIROS *et al.*, 2015).

Segundo Leite *et al.* (2018) VCL é um dos parâmetros relacionados a capacidade de fertilização, uma vez que espermatozoides com movimentos circulares tem mais facilidade na penetração do oócito. Esta correlação entre VCL e a fertilização foi observada em *Prochilodus lineatus* (CHIACCHIO *et al.*, 2017; VIVEIROS *et al.*, 2010; FIGUEROA *et al.*, 2016) e, também considerado que uma maior velocidade

curvilínea resultará, também em trajetórias espermáticas mais rápidas, por outro lado, maiores para VSL significam que a trajetória do espermatozoide é mais linear e regular com menor movimento lateral (CHIACCHIO *et al.*, 2017). Neste sentido, como os tratamentos T1, T7 e T8 propiciaram os valores mais altos para VCL e VAP e os dois últimos tratamentos, também propiciaram em valores altos para velocidade em linha reta (VSL), pode se inferir que T1, T7 e T8 são os protocolos que permitiram melhor condição de mobilidade espermática pós diluição.

Não foram encontrados trabalhos que analisaram os parâmetros obtidos através do CASA (VCL, VSL, VAP, SRT, LIN, WOB, ALH e BCF), para o sêmen somente diluído, os dados disponíveis só avaliaram estes parâmetros após o processo de criopreservação. Nascimento *et al.* (2010) trabalhando com o sêmen da pirapitinga criopreservado em solução de DMSO e glicose encontrou valores para VCL de 40  $\mu\text{m/s}$ , VSL 21  $\mu\text{m/s}$  e VAP de 30  $\mu\text{m/s}$ , enquanto em nosso estudo o tratamento T7, que continha a mesma solução crioprotetora apresentou valores maiores para os mesmos parâmetros, no entanto esses valores são para o sêmen somente diluído. Esta solução também foi testada para a criopreservação do sêmen de *Prochilodus brevis* no entanto as velocidades pós congelamento foram baixas (LOPES *et al.*, 2014).

Essa velocidade maior com o sêmen apenas diluído pode ser explicada, porque após o congelamento devido a exposição a baixa temperatura pode ocorrer uma diminuição dos valores destes parâmetros (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Sendo essa diminuição possivelmente resultado de danos morfológicos e estruturais sofridos pelos espermatozoides (LINHARES *et al.*, 2015).

Os valores dessas velocidades também podem ser influenciados por parâmetros como diâmetro da cabeça, comprimento do flagelo e frequência do batimento flagelar (LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015).

A solução composta por metil glicol + glicose + gema de ovo (T4) também já foi utilizada no congelamento de sêmen de *Colossoma macropomum* e resultou em velocidades altas VCL  $87\pm 13 \mu\text{m/s}$ , VSL  $57\pm 14 \mu\text{m/s}$  e VAP  $75\pm 15 \mu\text{m/s}$ , quando comparados com os valores obtidos para sêmen somente diluído de *Astyanax altiparanae* (NÍZIO-MARIA *et al.*, 2015).

Para linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB), as maiores porcentagens foram obtidas no tratamento composto por DMSO + glicose (T7 e T8)

ou BTS + DMSO (T5 e T6). Bashiyo-Silva (2014) avaliando o sêmen criopreservado da espécie *Brycon amazonicus* obteve LIN de  $67,1 \pm 8,7\%$ , STR de  $75,8 \pm 6,4\%$  e WOB de  $87,4 \pm 5\%$  (BASHIYO-SILVA, 2014). Esta diferença pode ser explicada por as espécies terem características seminais, quanto a osmoralidade, pH, concentração e motilidade diferentes.

Com relação a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) os tratamentos compostos por glicose e gema de ovo com DMSO ou MTG (T1, T2, T3 e T4) foram responsáveis pelos maiores valores relativos. Os valores de ALH em algumas espécies de peixe, como *Carassius carassius* e *Osmerus eperlanus* L., podem está associado a maturidade espermática (CEJKO *et al.*, 2018).

Sieczynski *et al.* (2015) relatou também a possibilidade de que este o ALH fosse influenciado pelos valores de VCL, em que uma diminuição da velocidade curvilínea resultou em uma redução dos valores de ALH. Sendo este parâmetro considerado de importância para predição de qualidade do sêmen.

Para batimento flagelar cruzado (BCF), os maiores valores obtidos foram nos tratamentos contendo DMSO em associação com BTS ou glicose. Chiacchio *et al.* (2017) com Characiformes registrou 23-24 Hz em BCF, na espécie *Prochilodus lineatus* e BCF de 24–25 Hz em amostras de *Brycon orbignianus* Boryshpolets *et al.* (2018) relata que os peixes têm batimento flagelar inicial alto em torno de 60 Hz por segundo e que, quanto maior o batimento flagelar maior a velocidade curvilínea.

Os parâmetros analisados acima, linearidade (LIN) retilinearidade (STR), oscilação (WOB), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento flagelar cruzado (BCF), são pouco utilizados para avaliação da qualidade do sêmen de peixes, principalmente pela falta de valores de referência para estes (NEUMANN *et al.*, 2017).

### 5.3 MOTILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO

Após o descongelamento do sêmen, não foi obtido motilidade espermática para nenhum dos tratamentos. Alguns fatores podem ser responsáveis pela perda da motilidade pós-congelamento, dentre estes fatores podemos citar o método de congelamento utilizado como um dos principais, fato confirmado por Irawan *et al.*

(2010) que mostrou que o congelamento em caixa de isopor com as distâncias das palhetas do nitrogênio de 2 cm por 5 e 15 minutos, assim como a distância de 6 cm por 5 minutos resultou na perda total da motilidade pós congelamento, os autores ainda verificaram que tempo de congelamento no vapor de nitrogênio também influencia uma vez que a maior motilidade foi encontrada utilizando a mesma altura de 2 cm no entanto em um tempo de 10 minutos.

A altura das palhetas do nitrogênio líquido no congelamento também depende da espécie utilizada, pois Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) utilizou a mesma distância utilizada neste trabalho (1 cm) para a espécie *Brycon cephalus* e obteve boas taxas de fertilização. Esta altura também foi usada no congelamento de sêmen da espécie marinha *Nibeia albiflora* proporcionando uma motilidade pós-congelamento 70-75% (DAI *et al.*, 2012)

O volume das palhetas também é um fator a ser considerado para avaliar a falta de motilidade, pós congelamento neste trabalho utilizamos as palhetas de 0,25mL devido à pouca quantidade de sêmen da espécie. Porém trabalhos já demonstraram que pode haver diferença na motilidade dependendo da palheta utilizada, Judicka *et al.* (2018) mostrou que a utilização de palhetas de 0,5 mL proporcionou maiores motilidades quando comparadas as palhetas de 0,25 mL para o sêmen da truta. No entanto para outras espécies a utilização de palhetas de 0,25 mL não afetou a motilidade após o descongelamento como no congelamento do sêmen de *Sparus aurata* L. (FABBROCINI *et al.*, 2015)

Além desses fatores citados a ausência de motilidade pós congelamento pode ser resultado da taxa de congelamento utilizada, segundo Chao e Liao (2001) a taxa de congelamento varia entre as espécies de peixes e afeta a sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelamento. Assim a taxa de congelamento utilizada deve promover a perda da água interna e estabelecer o equilíbrio de solutos entre os meios intra e extracelular, impedindo a formação de gelo intracelularmente (MAZUR, 1977, 1984).

He *et al.* (2011) demonstrou que a utilização de uma taxa de congelamento lenta para *Epinephelus akaara*, foi prejudicial para espermatozoides uma vez que a motilidade foi reduzida (-20%), enquanto que o congelamento rápido proporcionou alta taxa de motilidade.

Outro fator que pode influenciar na motilidade pós congelamento é a temperatura e tempo de descongelamento, Viveiros *et al.* (2012) comprovou essa influência no congelamento do sêmen de *Brycon opalinus*, em que a maior motilidade e o maior número de espermatozoides intactos após congelamento foi encontrada quando as palhetas foram descongeladas a 60 °C ao invés de 30 °C.

#### 5.4 INTEGRIDADE DE DNA

A análise de integridade do DNA mostrou que apenas tratamento composto por 5% de glicose + 10% de gema de ovo + 15% de metilglicol (T4) apresentavam núcleos bastante compactados, fato confirmado quando comparado este tratamento ao tratamento T3, que apresentam em sua composição as mesmas substâncias, mas T3 com menor concentração de Metil glicol, não foram observados os núcleos compactados, como os observados em T4, por isso, foi levantado a hipótese de que no tratamento T4 possa ter ocorrido alguma reação química, devido ao aumento da concentração de Metilglicol que impediu a lise das células, o que conseqüentemente influenciou na análise dos danos do DNA.

Assim o tratamento composto por BTS e DMSO (T5) teve o ID mais baixo entre todos os tratamentos, mostrando que o DNA dos espermatozoides deste tratamento não foi afetado pelo processo de criopreservação. Fato também observado para os tratamentos T1, T3 e T6 que também tiveram ID baixo. Cartón-Garcia *et al.* (2013) analisou o efeito do processo de criopreservação sobre o DNA de *Sparus aurata* e também verificou que os danos ocasionados no DNA eram baixos (menos de  $2,47 \pm 0,19\%$ ), o que mostrou que o protocolo utilizado forneceu proteção a nível de DNA.

Os tratamentos T7 e T8 foram os que apresentavam maior ID, indicando que a utilização de um extensor mais simples composto por glicose e DMSO foi menos eficaz para proteção do DNA. Essa fragmentação do DNA de espermatozoides devido ao processo de congelamento e descongelamento já foi relatada para outras espécies como o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (ZILLI *et al.*, 2003), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (CABRITA *et al.*, 2005) e *Prochilodus magdalenae* (MARTÍNEZ; GARCÍA; CARRASCO, 2012).

Ainda existe controvérsias quanto ao efeito desses danos do DNA no sucesso da fertilização. Sabemos que o início do desenvolvimento embrionário é controlado

apenas pela informação materna herdada (ZILLI *et al.*, 2003). Desta forma, os efeitos do dano ao DNA não seriam manifestados neste estágio. Além disso os danos sofridos pelo DNA podem ser reparados pelo mecanismo de reparo genético durante a embriogênese inicial (CABRITA *et al.*, 2005), não afetando a qualidade da prole. Fato confirmado por Labbe *et al.* (2001) que verificou em truta arco-íris o processo de criopreservação induziu um aumento da fragmentação do DNA, porém esses danos não afetaram a sobrevivência ou a qualidade da prole.

Apesar disso, alguns trabalhos demonstram que os danos do DNA afetam, tanto a fertilização quanto a qualidade da prole. Pérez-Cerezales *et al.* (2011) verificaram que utilização para fertilização, de espermatozoides criopreservados de truta, com DNA danificado, afetou negativamente o desenvolvimento da prole, devido ao aumento no comprimento dos telômeros. Assim como, algumas alterações na expressão gênica em embriões e larvas sobreviventes. Nathanailides *et al.* (2011) verificou a relação da fertilização com os danos do DNA de goldfish, em que o tratamento com maior dano no DNA foi responsável pela menor taxa de fertilização.

Outro estudo realizado com bovinos mostrou que a utilização de espermatozoides com DNA danificado, não afetou a fertilização, mas impede a formação do blastocisto, ocasionado assim a apoptose, mostrando que danificação do DNA dos espermatozoides pode ter efeito negativo sobre a prole (FATEHI *et al.*, 2006).

Desta forma, a utilização da análise da integridade do DNA para avaliar espermatozoides criopreservado, é uma importante ferramenta para auxiliar na melhoria dos protocolos de criopreservação, bem como para determinação da qualidade do sêmen criopreservado (CÁRTON-GARCIA *et al.*, 2013).

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- a) dentre as soluções crioprotetoras testadas como diluente para o sêmen de *Astyanax altiparanae*, as que proporcionaram melhores resultados de motilidade foram: T4 (MTG15% +A), T6 (DMSO15% +B) e T7 (DMSO10% +C);

- b) os tratamentos T1 (DMSO10% + A), T3 (MTG10%+A), T5 (DMSO10% +B) e T6 (DMSO15% +B) proporcionaram os menores índices de fragmentação de DNA dos espermatozoides de *A. altiparanae*;
- c) os protocolos para criopreservação seminal testados neste trabalho, não foram eficazes para manter a viabilidade espermática e capacidade de fertilização do sêmen de *A. altiparanae*.

## REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, Hiroshima v. 62, n. 6, p. 1160–1172, 2004.
- AHN, J. Y.; PARK, J. Y.; LIM, H. K. Cryobiology Effects of different diluents , cryoprotective agents , and freezing rates on sperm cryopreservation in *Epinephelus akaara*. **Cryobiology**, Jeonnam, v. 83, p. 60–64, 2018.
- AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, Giessen, v. 60, n. 2, p. 269–279, 2003.
- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic. **Cryobiology**, Cinco Saltos, v. 50, n. 3, p. 239–249, 2005.
- ALDERSON, R.; MACNEIL, A. J. Preliminary investigations of cryopreservation of milt of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and its application to commercial farming. **Aquaculture**, Lochailort, v. 43, p. 351-354, 1984.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, Denver, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, Giessen, v. 64, p. 895-907, 2004.
- ARCINIEGAS, P.; RODRÍGUEZ, M. M.; CRUZ-CASALLAS, J. E. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado. **Orinoquia**, Villavicencio, v. 9, n. 2, p. 28-37, 2005.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.
- AZEVEDO, D. M. M. R.; TONIOLLI, R. Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácidos 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos marota. **Ciência animal**, Fortaleza, v. 9, n. 1, p. 37–42, 1999.

BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, Québec v. 83, n. 4, p. 393-401, 2003.

BARKAY, J.; ZUCKERMAN, H.; HEIMAN, M. A. New Practical method of freezing and storing human sperm and a preliminary report on its use. **Fertility and Sterility**, Sarid, v. 25, n. 5, p. 399–406, 1974.

BASHIYO-SILVA, C. **Indução a espermiacão e criopreservação espermática de *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Teleostei: Characidae)**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Faculdade de Engenharia, Univerdade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Ilha Solteira, 2014.

BASS, L. D.; DENNISTON, D. J.; MACLELLAN, L. J.; MCCUE, P. M.; SEIDEL-JR, G. E.; SQUIRES, E. L. Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. **Theriogenology**, Fort Collins, v. 62, n. 6, p. 1153–1159, 2004.

BEM, J. C.; FONTANETTI, C. S.; SENHORINI, J. .; PARISE-MALTEMPI. Effectiveness of Estradiol Valerate on Sex Reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, p. 283-290, 2012.

BERNÁTH, G.; ZARSKI, D.; KÁSA, E.; STASZNY, Á.; VÁRKONYI, L.; KOLLÁR, T.; HEGYI, Á.; ZOLTÁN, B.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, Á. General and Comparative Endocrinology Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programable freezer. **General and Comparative Endocrinology**, Gödöll, v. 237, n. 1, p. 78–88, 2016.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; RAMBO, G.; CORRÊA, E. K., LUCIA-JÚNIOR, T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1978–1983, 2008.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, 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. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, Salvador, v. 5, n. 1, p. 27–32, 2004.

BLAXTER. J. H. S. Sperm storage na cross-fertilization of spring and Autumm spawning herring. **Nature**, Aberdeen, n. 4391, p. 1189–1190 1953.

BORYSCHPOLETS, S.; KLOLODNYI, V.; COSSON, J.; DZYUBA, B. Fish sperm motility analysis: the central role of the flagellum. **Reproduction, Fertility and Development**, Vodňany, v. 30, n. 6, p. 833-841, 2018.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

- BUTTS, I. A. E.; LITVAK, M. K.; KASPAR, V.; TRIPPEL, E. A. Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: Effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology. **Cryobiology**, Vodnany, v. 61, n. 2, p. 174–181, 2010.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Leon, v. 201, n. 3-4, p. 301–314, 2001.
- CABRITA, E.; S. ENGROLA, S.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; POUSÃO-FERREIRA, P.; DINIS, M. T. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. **Aquaculture**, Olhão, v. 287, n. 1–2, p. 152–157, 2009.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Review article cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Applied Ichthyology**, Verlag, v. 26, n. 5, p. 623–635, 2010.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; REBORDINOS, L.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 50, p. 144–15, 2005.
- CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, P. S.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryo Letters Journal**, Aracaju, v. 33, n. 5, p. 385–393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Florianópolis, v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003.
- CARROLL, J.; GOSDEN, R. G. Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. **Human Reproduction**, Edinburgh, v. 8, n. 8, p. 1163–1167, 1993.
- CÁRTON-GARCIA, F.; RIESCO, M. F.; CABRITA, E.; HERRÁEZ, M. P.; ROBLES, V. Quantificação de lesões em genes nucleares e mitocondriais de esperma criopreservado de *Sparus aurata*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 402-402, p. 106-112, 2013.
- CEJKO, B. I.; HORVÁTH, A.; KOLLÁR, T.; KÁSA, E.; LUJIĆ, J.; MARINOVIĆ, Z.; URBÁNYI, B.; KOWALSKI, R. K. Optimisation of sodium and potassium concentrations and pH in the artificial seminal plasma of common carp *Cyprinus carpio* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 44, n. 6, p. 1435-1442, 2018.
- CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 161-189, 2001.

- CHIACCHIO, I. M. D.; ALMEIDA, I. L. G.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. **Theriogenology**, Lavras, v. 90, p. 284-288, 2017.
- CIERESZKO, A.; DIETRICH, G. J.; NYNCA, J.; DOBOSZ, S.; ZALEWSKI, T. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. **Aquaculture**, Olsztyn, v. 420-421, n. 1, p. 275-281, 2014.
- CIERESZKO, A.; DIETRICH, G. J.; WOJTCZAK, M.; SOBOCKI, M.; HLIWA, P.; KUŹMIŃSKI, H.; DOBOSZ, S.; SŁOWIŃSKAI, M.; NYNCA, J. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen from Lake Łebsko, Poland. **Fundamental and Applied Limnology**, Stuttgart, v. 173, n.1, p. 59-65, 2008.
- CIERESZKO, A.; WOLFE, T. D.; DABROWSKI, K. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 73, p. 128-138, 2005.
- COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-edta-egg yolk extender and packaged in 1.0-ml straws. **Theriogenology**, Colorado, v. 20, n. 6, p. 735-741, 1983.
- CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, Lexington, v. 48, n. 5, p. 721-731, 1997.
- COSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Belo Horizonte, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.
- CRUZ-CASALLAS, P. E. C.; ROBLES, V. M. M.; SANTAMARÍA, Y. M. V. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Villavicencio, v.19, n. 2, p. 152-159, 2006.
- CUEVAS-URIBE, R.; LEIBO, S. P.; DALY, J.; TIERSCH, T. R. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. **Cryobiology**, New Orleans, v. 63, n. 3, p. 186-197, 2011.
- CURRY, M. R.; MILLAR, J. D.; TAMULI, S. M.; WATSON, P. F. Surface Area and Volume Measurements for Ram and Human Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Londres, v. 55, n. 6, p. 1325-1332, 1996.
- DAI, T.; ZHAO, E.; LU, G.; CHE, K.; HE, Q.; LU, Y.; FANG, Q.; WANG, H.; ZHENG, L.; LI, S.; HUANG, C.; DONG, Q. Sperm cryopreservation of yellow drum *Nibea albiflora*: A special emphasis on post-thaw sperm quality. **Aquaculture**, Belo Horizonte, v. 368-369, p. 82-88, 2012.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, Fort Collins, v. 48, n. 5, p. 831–841, 1997.

DEANESLY, R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. **Journal Endocrin**, Londres, v. 11, n. 2, p. 197-200, 1954.

DIETRICH, G. J.; NYNCA, J.; SZCZEPKOWSKI, M.; DOBOSZ, S.; SZCZEPKOWSKA, B.; CIERESZKO, A. The effect of cryopreservation of semen from white fish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. **Aquaculture**, Rutki, v. 464, p. 60–64, 2016.

DIETRICH, G. J.; SZPYRKA, A.; WOJTCZAK, M.; DOBOSZ, S.; GORYCZKO, K.; ZAKOWSKI, L.; CIERESZKO, A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1809–1822, 2005.

FABBROCINI, B. A.; FABBROCINI, A.; ADAMO, R. D.; PELOSI, S.; OLIVEIRA, L. F. J.; DEL-PRETE, F.; SILVESTRI, F.; VITIELLO, V.; SANSONE, G. Sperm motility evaluation following long-term storage (5 years) of cryopreserved sea bream (*Sparus aurata* L., 1758) semen. **Applied Ichthyology**, Napoli, v. 31, n. 1, p. 104–107, 2015.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, Maryland, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVEERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B. GADELLA, B. M. DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.

FAUSTINO, F.; SILVA, R. C.; HILBIG, C. C.; MAKINO, L. C.; SENHORINI, J. A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; NAKAGHI, L. S. O. Spermatozoon ultrastructure and semen parameters of Brycon vermelha (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, p. 17-23, 2015.

FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; DRUMOND, M. M.; ROSA, P. V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 122, n.1, p. 259–263, 2010.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. O.; LUZ, R. K.; TATAJE, D. A. R.; ESQUIVEL, J. R.; RESTREPO, J. B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 57–60, 2001.

FETTEROLF, P. M.; ROGERS, B. J. Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. **Molecular Reproduction and Development**, Nashville, v. 27, n. 4, p. 326–331, 1990.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; MERINO, O.; UBILLA, A.; RISOPATRÓN, J.; FARIAS, J. G. Cryopreservation of Atlantic Salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. **Journal of fish biology**, Temuco, v. 89, n. 3, p. 1537–1550, 2016.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. **Molecular Reproduction and Development**, Ottawa, v. 25, p. 123-129, 1990.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y. Avaliação da qualidade e crio - preservação em forma de "pellets" do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.12, n. 4, p. 7-11, 1985.

FOOTE, R. H.; ARRIOLA, J. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. **Journal of Dairy Science**, Ithaca, v. 70, p. 2642–2647, 1987.

FOOTE, R. H.; KAPROTH, M. T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal of Dairy Science**, Shawano, v. 85, n. 2, p. 453–456, 2002.

FRESNEDA, A.; LENIS, G.; AGUDELO, E.; ÁNGEL, M. O. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 17, n. 4, p. 46–52, 2004.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. **World Wide Web electronic publication**. [S. l.], 2018.

GAITÁN-ESPITIA, J. D. *et al.* Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. **Aquaculture**, Santa Marta, v. 384–387, p. 6–12, 2013.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through computer-aided sperm analysis (CASA-Mot) systems. **Reproduction, Fertility and Development**, Valencia, v. 30, n. 6, p. 820-832, 2017.

GALO, J. M.; STREIT-JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; DIGMAYER, M.; ANDRADE, V. X. L.; EBERT, A. R. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 693–699, 2011.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Nevada, v. 34, n. 5, p. 399–404, 1999.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. Editora Unesp, São Paulo, 2003. 56 p.

GEBAUER, M. R.; PICKETT, B. W.; KOMAREK, R. J.; GAUNYA, W. S. Motility of bovine spermatozoa extended in " defined " diluents. **Journal of Dairy Science**, Connecticut, v. 53, n. 6, p. 817–823, 1970.

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M. CH.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MÁRTINEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in biociphos plus and trilady. **Reproduction in Domestic Animals**, Skara, v. 35, n. 2, p. 69–77, 2000.

GODIM, D.; CASTRO, A. C.; VIDAL, M.; FERREIRA, M. A. R.; CURY, L. J.; PINHO, T. G. Métodos de congelamento One Step e Two Steps do sêmen de cães, diluído em solução de água de coco e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Ondina, v.10, n.2, p. 417–422, 2009.

GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Esmeraldas, v.32, n. 6, p. 1537–1543, 2003.

GONÇALVES, A. C. S. G.; NASCIMENTO, A. F.; COSTA, A. C.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reprodução**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 62-70, 2013.

GONÇALVES, L. U.; FERROLI, F.; MARIA, E.; VIEGAS, M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Pirassununga, v. 41, n. 9, p. 1967–1974, 2012.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. 2004.** 2004. 94 f. Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Byology of reproduction**, Columbia, v. 1816, n. 6, p. 1811–1816, 2002.

GWO, J. Cryopreservation of black grouper (*Eninnehelus malabaricus*) spermatozoa. **Theriogenology**, Taiwan, v. 39, n. 6, p. 1331–1342, 1993.

HARVEY, B. Cryopreservation of Sarotherodon mossambicus spermatozoa. **Aquaculture**, Canadá, v. 32, n. 3-4, p. 313–320, 1983.

HARVEY, L. B.; KELVIN, G. M. B. Basic Principles of Cryobiology. **Journal of Cradiac Surgery**, Charleston, v. 2, n. 1, p. 137–143, 1987.

HE, Q.; LU, G.; CHE, K.; ZHAO, E.; FANG, Q.; WANG, H.; LUI, J.; HUANG, C.; DONG, Q. Sperm cryopreservation of the endangered red spotted grouper, *Epinephelus akaara* with a special emphasis on membrane lipids. **Aquaculture**, Belo Horizonte, v. 318, p. 185-190, 2011.

HINSCH, E.; HINSCH, K. D.; BOEHM, J. G.; SCHILL, W. B.; MUELLER-SCHLOESSER, F. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 32, p.143-149, 1997.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Londres, v. 53, p. 47-58, 2000.

HORVÁTH, Á.; MISKOLCKI, E.; MIHÁLFY, S.; ÖSZ, K.; SZABÓ, K.; URBÁNYI, B. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 54, p. 251–257, 2007.

HOYLE, R. J.; IDLER, D. R. Preliminary results in the fertilization of egg" with frozen sperm of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Journal of the Fisheries Research Board**, Canadá, v. 25, n. 6, p. 1295–1297, 1968.

HUANG, C.; DONG, Q.; TIERSCH, T. R. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 62, p. 971-989, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**, Rio de Janeiro, 2016. v. 44.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBio - Ministério do Meio Ambiente. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF, 2016.

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

JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M. J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, Ardabil, v. 96, p. 58–63, 2011.

JAHNEL, F. Über die Widerstandsfähigkeit von menschlichen spermatozoonen gegenüber starker Kälte. **Klinische Wochenschrift**, München, n. 37, 1938.

JAUME, C. M.; CAMPOS, A. L. Criopreservação de embriões de camundongos e bovinos utilizando metanol como crioprotetor. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 1, p. 9-13, 1990.

JING, R.; HUANG, C.; BAI, C.; TANGUAY, R.; DONG, Q. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebra fish sperm. **Aquaculture**, Wenzhou, v. 290, p. 165–171, 2009.

JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; LISZEWSKA, E.; DOBOSZ, S.; ZALEWSKI, T.; CIERESKO, A. Potassium ions in extender differentially influence the post-thaw sperm motility of salmonid fish. **Cryobiology**, Olsztyn, v. 73, p. 248–256, 2016.

JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; LISZEWSKA, E.; DOBOSZ, S.; ZALEWSKI, T.; CIERESKO, A. Optimal sperm concentration in straws and final glucose concentration in extender are crucial for improving the cryopreservation protocol of salmonid spermatozoa. **Aquaculture**, Olsztyn, v. 486, p. 90–97, 2018.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of japanese white rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, Kanagawa, v. 52, n. 4, p. 511-516, 2006.

KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, n.1, p. 61-66, 1999.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 363, p. 89–96, 1996.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, [S. l.], v. 3, p. 103–115, 1995.

KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull , ram , and boar spermatozoa : a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, Londres, v. 46, p. 246–253, 2003.

LABBE, C.; MARTORIATI, A.; DEVAUX, A.; MAISSE, G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 60, p. 397-404, 2001.

LANG, R. P.; RILEY, K. L.; CHANDLER, J. E.; TIERSCH, T. R. The use of diary protocols for sperm cryopreservation of blue catfish *Ictalurus furcatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Louisiana, v. 34, n. 1, p. 66-75, 2003.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; JUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, Ithaca, v. 172, p. 1–9, 2016.

LEEUW, F. E.; LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H. G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing, **Cryobiology**, Arnhem, v. 30, p. 32-44, 1993.

LEITE, J. S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; CAMPELLO, C. C.; CAMPOS, A. C. N.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Seasonal variation in seminal quality in Brazilian bocachico (Teleostei, Characiformes). **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 3, p. 759 – 766, 2018.

LEITE, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; NUNES, L. T.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, Maranhão, v. 6, n. 2, p. 23-29, 2011b.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Científica: Ciência Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.13, n.4, p. 279-286, 2011a.

LEUNG, L. K. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates niloticus* (Teleostei:Centropomidae). **Aquaculture**, St Lucia, v. 64, p. 243–247, 1987.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p.245-269,

LINHARES, F. R. A.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; CARVALHO, M. A. M.; PINHEIRO, R. R. R.; OLIVEIRA, F. C. E.; NUNES, J. F. Cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum criopreservados em água de coco em pó ACP-104. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Fortaleza, v. 67, p. 1313–1320, 2015.

LINHARES, F.R.A.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M; LOPES, J.T.; PINHEIRO, R.R.R.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Anormalidades em espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio*, frescos ou criopreservados em diluidor a base de água de coco em pó (ACP-104®). VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal. **Ciência Animal**, Santa Maria, v. 12, p. 671–674, 2012.

LIU, Y.; GRIER, H.; TIERSCH, T. R. Production of live young with cryopreserved sperm from the endangered livebearing fish Redtail Splitfin (*Xenotoca eiseni*, Rutter, 1986). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 196, p. 77-90, 2018.

LOPES, J. T.; PINHEIRO, J. P. S.; NUNES, L. T.; PINHEIRO, R. R. R.; SOUZA, M. E. M.; ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, R. V.; CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n.3, p.170-175, 2014.

LÓPEZ, D. I.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition and osmolality affects post-thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, Lavras, v. 31, n. s1, p. 114-118, 2015.

LOVELOCK, J. E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. **Biochemical Journal**, Londres, v. 56, p. 265–270, 1953.

LOVELOCK, J. E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemical Journal**, Londres, v. 58, 1954.

LUJIĆ, J.; BERNÁTH, G.; MARIONOVIĆ, Z.; RADOJKOVIĆ, N.; SIMIĆ, V.; ĆIRKOVIĆ, M.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, A. Fertilizing capacity and motility of tench *Tinca tinca* (L., 1758) sperm following cryopreservation. **Aquaculture Research**, Gödöllő, v. 48, p. 102–110, 2017.

LUYET, B. J.; HODAPP, E. L. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. **Experimetal Biology and Medicine**, London, v. 39, p. 433–434, 1938.

LUZ, R. K.; FERREIRA, A. A.; REYNALTE, D. A. T.; ZANIBONI-FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2001.

LUZ, S. L. N.; NEVES, P. J.; GONÇALVES, P. B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 2, 2000.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Irlanda, v. 260, p. 298-306, 2006b.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction Science**, Lavras, v.3, n.1, p.55-60, 2006a.

MARSHBURN, P. B.; MCINTIRE, D.; CARR, B. R.; BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, Dallas, v. 58, n. 1, p. 179–186, 1992.

MARTÍNEZ, J. G.; GARCÍA, V. A.; CARRASCO, S. P. DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi: Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. **Neotropical Ichthyology**, Sao Paulo, v. 10, p. 577-586, 2012.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Physiological Society**, Oak Ridge, v. 247, p. 125-147, 1984.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, Oak Ridge, v. 272, p. 251–272, 1977.

MEDEIROS, A. S. L.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, Botucatu, v.58, p.273-276, 2002.

MEDINA-ROBLES, V. M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Villavicencio, v. 39, n. 3, p. 229–238, 2007.

MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 3, p. 380-385, 2006.

MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, C. E.; OLIVEIRA, M. S.; J. T.; NUNES, J. F. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. **Ciência Animal**, Goiás, v. 22, n. 1, p. 269-28. 2012.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES-JR, J. B. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, Porto Velho, v. 38, n. 2, p. 365-368, 2008.

MISKOLCZI, E.; MIHÁLFFY, S.; VÁRKONYI, E. P.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, A. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. **Aquaculture**, Gödöllő, v. 247, p. 119–125, 2005.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; BRUEMMER, J. E.; GRAHAM, J. K. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cyosurvival of equine spermatozoa. **Scientific Papers**, Fort Collins, v. 26, n. 5, p. 215–218, 2006.

MORAES C. N.; NEVES J. P.; GONÇALVES P. B. D.; OLIVEIRA J. F. C.; SCHWEITZER C. M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etilenoglicol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A. L. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 305–311, 2007.

- MURGAS L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FONSECA, F. R. T.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 36, n. 1993, p. 526–531, 2007.
- MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1810–1814, 2003.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; NÍZIO-MARIA, A. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Lavras, v. 33, n. 6, p. 1361–1365, 2004.
- MURGAS, L. D.; FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, E. S.; VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191 2011.
- NASCIMENTO, A. F.; GONÇALVES, A. C. S.; REIS-NETO, R. V.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). **Animal Reproduction Science**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 103-110, 2012.
- NASCIMENTO, A. F.; MARIA, A. N.; PESSOA, N. O.; CARVALHO, M. A. M.; VIVEIROS, A. T. M. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 118, p. 324-329. 2010.
- NASCIMENTO, N. F. **Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*)**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2015.
- NATHANAILIDES, C.; CHANZAROPOULOS, T.; BARBOUTI, A.; PERDIKARIS, C.; ZHANG, T. DNA fragmentation, linear velocity and fertilizing ability of reactivated cryopreserved goldfish sperm using different cryoprotectants. **Biotechnology, Raidurgam Village**, v. 10, p. 514-520, 2011.
- NAVARRO, R. D.; NAVARRO, F. K. S. P.; FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, M. M. Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis spp.*) fed diet with different oil sources. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 399-404, 2014.
- NEUMANN, G.; BERNADES-JÚNIOR, J. J.; SANCHES, P. V.; PIANA, P. A.; BOMBARDELLI, R. A. Contribution of the CASA system, based on open source software, to the assessment of sperm characteristics: informetric and usage-based approaches. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Toledo, v. 46, n. 7, p. 560-568, 2017.

- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p.135-139, 2002.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 651-659, 2006.
- NÍZIO-MARIA, A.; CARVALHO, A. C. M.; ARAÚJO, R. V.; SANTOS, J. S.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 70, p. 109-114, 2015.
- NYNCA, J.; DIETRICH, G. J.; GRUDNIEWSKA, J.; CIERESZLO, A. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. **Aquaculture**, Olsztyn, v. 433, p. 62–65, 2014.
- NYNCA, J.; JUDYCKA, S.; LISZEWSKA, E.; DOBOSZ, S.; CIERESZKO, A. Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. **Aquaculture**, Olsztyn, v. 477, p. 23–27, 2017.
- OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbits. **Experimental Animals**, Tóquio, v. 56, n. 1, p. 29-34, 2007.
- OLIVEIRA E. C. S.; JULIANI G. C.; MARQUES-JR A. P.; HENRY M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1116-1122, 2006.
- OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; IZAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Lavras, n. 59, p. 1509–1515, 2007.
- ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Lavras, v. 311, p. 241–247, 2011.
- PAPA, F. O.; FELÍCIO, G. B.; MELO-OÑA, C. M.; ALVARENGA, M. A.; VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J. N.; DELL'AQUA-JR, J. A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, Botucatu, v. 129, p. 73–77, 2011.
- PARKES, A. S. Preservation of human spermatozoa at low temperatures. **British Medical Journal**, Hampstead, p. 212-2013, 1945.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Ithaca, v. 38, p. 209-222, 1992.

PAYNTER, S. J.; COOPER, A.; FULLER, B.; SHAW, R. W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: Structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 38, p. 301-309, 1999.

PÉREZ-CEREZALES, S.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; BEIRÃO, J.; HERRÁEZ, M. P. Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 76, p. 1234-1245, 2011.

PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; DE PAZ, P.; HERRÁEZ M. P. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, p. 605–613, 2009.

PINEDA-SANTIS, H.; GÓMEZ-OQUENDO, J.; MONTOYA-PÁEZ, J.; TORO-RENDÓN, V.; ACEVEDO-VILLA, O.; RESTREPO-BETANCUR, G. Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae). **Orinoquia**, Villacencio, v. 19, n. 2, p. 166-173, 2015.

PINHEIRO, J. P. S.; LEITE-CASTRO, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.17, n. 2, p. 267-273, 2016.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, Londres, v. 164, p. 666, 1949.

RANA, K. J.; MCANDREW, B. J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture**, Stirling, v. 76, p. 335–345, 1989.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F., MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, Porto Alegre, v. 89, p. 12–47, 2016.

REIS, R.E.; KULLANDER, O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

RODRIGUES, M. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; QUIRINO, P. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Spermatogenesis in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: A histological analyses with emphasis to spermatogonial and spermatid types. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 541, p. 697-705, 2015.

- RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS, G.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (casa), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Leuven, v. 55, p. 751–769, 2000.
- SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo amarelo em Monte Castelo/ SP: um estudo de caso. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 3, n. 7, p.307-315, 2011.
- SALMITO-VANDERLEY, C.; PINHEIRO, P. S.; LOPES, J. T.; LEITE, L. V. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 8, Supl. 2, p. 343-350, 2014.
- SANCHES, E. A.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C. B. R.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; ROMAGOSA, E. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 319, p. 453-458, 2011.
- SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S.; CERQUEIRA, V. R. Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris*. **Brasil jornal de Biologia**, Ubatuba, v. 75, n. 3, p. 662–669, 2015.
- SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SOUZA, B. E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 11, p. 2091-2098, 2009.
- SANTOS, M. P.; YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; ADAMOV, N. S. M.; NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, New York, p. 1-13, 2016.
- SCHULTER, E. P; VEIRA-FILHO, J. E. R. Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Brasília, DF: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA, 2017.
- SHAFFNER, C. S.; HENDERSON, E. W.; CARD, C. G. Viability of Spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. **Poultry Science**, Champaign, v. 20, p. 259-265, 1941.
- SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae)**. 2004. 124 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2004.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; YASUI, G. S.; SILVA, J. F. S.; GODINHO, H. P.; SOUZA, G. Efeitos da osmolalidade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 315, p. 430-433, 2007.

SIECZYŃSKI, P.; CEJKO, B. I.; GRYGORUK, C.; GLOGOWSKI, J. Cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) and sterlet (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus, 1758) semen and its influence on sperm motility parameters assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 31, p. 99-103, 2015.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 1021–1025, 2000.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, Fortaleza, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. D. C.; SILVA, L. D. M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Sao Paulo, v. 43, n. 6, p. 767–774, 2006.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; VIDAL, A. H.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. P. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. **Animal Reproduction Science**, Recife, v. 132, p. 155–158, 2012.

SILVA, J. M. A.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; PEREIRA, G. J. M.; NAVARRO, R. D.; MELLO, R. A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Lavras, v. 10, n. 3, p. 668-677, 2009.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. B.; SILVEIRA, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Botucatu, v. 36, p. 387–395, 2007.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SILVA, A. P. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Morphology of the urogenital papilla and its component ducts in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, Sao Paulo, v. 13, p. 309-316, 2015.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Waltham, v. 175, p. 184–191, 1988.

SMITH, A. U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, Londres, v. 166, p. 2, 1950.

SNEED, K. E.; CLEMENS, H. P. Survival of fish sperm after freezing and storage at low temperatures. **The Progressive Fish-Culturist**, Norman, v. 18, n. 3, p. 99-103, 1956.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Itabuna, v. 59, n. 1, p. 56–64, 2007.

Spallanzani L. **Opuscoli di fisica, animale, e vegetabile**. [S. l.]: Modena, 1776

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, Fort Collins, v. 62, p. 1056–1065, 2004.

STEIN, H.; BAYRLE, H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, Les Ulis, v. 18:4, p. 1073-1076, 1978.

STREIT JUNIOR, D. P.; OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M.; DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 2, n. 35, p.159-167, 2009.

STREIT-JR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D.; OLIVEIRA, C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

STREIT-JR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; VARGAS, L. D. M.; WATANABE, A. L. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus*, Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, Porto Alegre, v. 68, p. 373-377, 2008.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, Belo Horizonte, v. 105, p. 283–291, 2008.

TIBA, R. M.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S.; OSTINI, S. Diluentes e proporções sêmen : diluente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 99–110, 2009.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G. H.; FRANCESCHINI, P. H.; MORATO, F. M. A. C. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação *in vitro* e *in vivo*. **Arquivo Brasileiro Veterinário de Zootecnia**, Fortaleza, v. 62, p. 1072–1079, 2010.

TUNCER, P. B.; TAŞDEMİR, U.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; ÖZGÜRTAŞ, T.; COŞKUN, E.; EROL, H.; AYDIN, F. N.; GÜRCAN, I. S. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen – thawed Angora buck semen. **Small Ruminant Research**, Ankara, v. 113, p. 383–389, 2013.

VARELA-JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA-JR, T.; STREIT-JR, D. P.; FIGUEIREDO, M. R. C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, Rio Grande, v. 78, p. 244-251, 2012.

VASCONCELOS, A. M. M. A.; MORAES, G. V.; RIGOLON, L. P.; MOREIRA, I.; MARTINS, E. N. Efeito de sêmen resfriado e diluído em Beltsville Thawing Solution, zorlesco-modificado e BTZOR no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 402–408, 2001.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; GUSMÃO-POMPIANI, P.; VICENTINI, C. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, Chichester, v. 87, p. 305–313, 2006.

VIDAMENT, M.; DAIRE, J.M.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, Nouzilly, v. 58, p. 249-251, 2002.

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A.; CANEPPEL, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Chichester, v. 42, p.858-865, 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, Lavras, v. 78, p. 361-368, 2012.

VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; ORFA, L. H. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of i and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology Biochemistry**, Dordrecht, n. 41, p. 193–201, 2015.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I.B. A simple , inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Lavras, v. 112, p. 293–300, 2009b.

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 54, p. 1395-1408, 2000.

- VIVEIROS, A. T. M.; OLIVEIRA, A. V.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; SOUZA, J. C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009a.
- VIVEIROS, A. T.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n. 1, p. 551–556, 2010.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Londres, v. 60-61 p. 481–492, 2000.
- WEI, F.; YU, L.; LI, R.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; WANG, H.; LIANG, J.; MA, R.; QI, H.; QIN, Q.; ZHANG, R.; ZHU, S.; LI, C. Studies of the cryopreservation condition of *Gymnocypris przewalskii* spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Xining, v. 188, p. 13–20, 2018.
- YANG, H.; DALY, J.; CARMICHAEL, C.; MATTHEWS, J.; VARGA, Z. M.; TIERSCH, T. A procedure-spanning analysis of plasma membrane integrity for assessment of cell viability in sperm cryopreservation of zebrafish *Danio rerio*. **Zebrafish**, Louisiana, v. 13, n. 2, p. 144-151, 2016.
- YANG, H.; HAZLEWOOD, L.; WALTER, R. B.; TIERSCH, T. R. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, *Xiphophorus couchianus*: Male-to-male variation in post-thaw motility and production of F<sub>1</sub> hybrid offspring. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Louisiana, v. 149, n. 2, p. 233–239, 2009.
- YANG, S.; HAN, L.; HUANG, R.; LIUFU, Y.; MENG, Z.; LIN, H. Optimization of conditions for the cryopreservation of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) sperm. **Cryobiology**, Guangzhou, v. 76, p. 104–110, 2017.
- YASUI, G. S.; ARIAS-RODRIGUEZA, L.; FUJIMOTOA, T.; ARAI, K. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 116, p. 335–345, 2009.
- YASUI, G. S.; SANTOS, M. P.; NAKAGHI, L. S. O.; SENHORINI, J. A.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, Pirassununga, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2014.
- ZANANDREA, A. C. V.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Induced reproduction of dourado (*Salminus brasiliensis*): fertilization with sperm cryopreserved in ACP®-104. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 38, n. 1, p. 17-22, 2016.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; STORELLI, C.; VILELLA, S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 47, p. 227-235, 2003.

ZIMBA, R. D.; SUSSEL, F. R.; OLIVEIRA, K. R. B.; SEGURA, J. G.; LIMA, C. G.; VIEGAS, E. M. M. Desempenho reprodutivo de lambaris alimentados com grãos secos de destilaria. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 20-34, 2017.