



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus*) E PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

ADALMYR MORAIS BORGES

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus*) E PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

ADALMYR MORAIS BORGES

ORIENTADOR: RODRIGO DIANA NAVARRO

CO-ORIENTADOR: IVO PIVATO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 199D/2018

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2018**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BORGES, A. M. **Criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 101p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mc
Morais Borges, Adalmyr
Criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). / Adalmyr Moraes Borges; orientador Rodrigo Diana Navarro; co orientador Ivo Pivato. -- Brasília, 2018.
101 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciência Animal) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. peixe nativo. 2. siluriforme. 3. espermatozoide. 4. congelamento. 5. antioxidante. I. Diana Navarro, Rodrigo, orient. II. Pivato, Ivo, co-orient. III. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus*) E PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

ADALMYR MORAIS BORGES

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

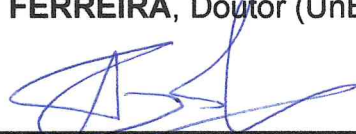
APROVADA POR:



RODRIGO DIANA NAVARRO, Doutor (UnB)
(ORIENTADOR)

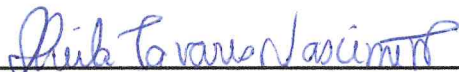


MARIA FERNANDA NINCE FERREIRA, Doutor (UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)



ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, Doutor (EMBRAPA)
(EXAMINADOR EXTERNO)

RONALD KENNEDY LUZ, Doutor (UFMG)
(EXAMINADOR EXTERNO)



SHEILA TAVARES NASCIMENTO, Doutor (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

Brasília, 22 de fevereiro de 2018.

À minha esposa Andréa, e às minhas filhas Raquel e Rebeca.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS pelo dom da vida, e pela oportunidade apresentada.

Ao Professor Rodrigo Diana Navarro, pela grande paciência e sabedoria, me orientando e estimulando a prosseguir.

Ao Professor Ivo Pivato, pelos ensinamentos e preciosas dicas no congelamento de sêmen, e principalmente pelo grande incentivo nas pesquisas.

Aos colegas de doutorado Bruno e Allysson, pelo apoio e companheirismo ao longo do curso.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Aquicultura da FAV, em especial à Karina e à Marcela pelo auxílio no processamento das amostras.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Microscopia e Microanálise do IB, em especial à Professora Sônia Bão, e aos técnicos Ingrid e Guilherme, pelo suporte no processamento e na análise das amostras.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Cenargen, em especial à Pesquisadora Margot Dode, e à colega Andrielle, pela disponibilidade no treinamento, e apoio na análise das amostras.

E um agradecimento especial ao Bruno Melo, e ao seu pai Renato Melo, piscicultores apaixonados e dedicados, proprietários da piscicultura Cia do Peixe, que colocaram a disposição os animais e as instalações utilizados nos experimentos.

Muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Peso corporal, comprimento e características do sêmen fresco em jundiá amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i>) mantido em cativeiro.....	39
Tabela 2. Análise morfométrica de espermatozoides de jundiá amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i>) em cativeiro.....	42
Tabela 3. Taxa, vigor e duração de motilidade em sêmen criopreservado de jundiá amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i>) utilizando três soluções diluidoras e duas soluções ativadoras.....	43
Tabela 4. Morfologia espermática em sêmen criopreservado de jundiá amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i>) utilizando três meios de congelamento.....	43

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Peso corporal e características de motilidade de sêmen fresco em machos de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) mantidos em cativeiro.....	70
Tabela 2. Motilidade espermática total pós-descongelamento, em sêmen de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) com três crioprotetores em diferentes concentrações.....	71
Tabela 3. Cinética espermática pós-descongelamento, em sêmen de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) com três crioprotetores em diferentes concentrações.....	72
Tabela 4. Viabilidade celular pós-descongelamento, em sêmen de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) com três crioprotetores em diferentes concentrações.....	73
Tabela 5. Motilidade espermática total pós-descongelamento, em sêmen de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) com três antioxidantes em diferentes concentrações.....	76
Tabela 6. Cinética espermática pós-descongelamento, em sêmen de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) com três antioxidantes em diferentes concentrações.....	77
Tabela 7. Viabilidade celular pós-descongelamento, em sêmen de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) com três antioxidantes em diferentes concentrações.....	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Vista geral do espermatozoide de jundiá amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i>).....	40
Figura 2. Vista interna do espermatozoide de jundiá amazônico (<i>Leiarius marmoratus</i>).....	41
Figura 3. Principais anormalidades morfológicas observadas no sêmen do jundiá amazônico pós-descongelamento.....	44

CAPÍTULO 3

Figura 1. Duração e motilidade espermática pós-descongelamento, com três crioprotetores dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%).....	73
Figura 2. Cinética espermática pós-descongelamento, com três crioprotetores dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%).....	74
Figura 3. Viabilidade celular pós-descongelamento, com três crioprotetores dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%).....	75
Figure 4. Duração e motilidade espermática pós-descongelamento com BTS (B) e três antioxidantes combinados entre si, ácido ascórbico 1mM (C), α -tocoferol 0,1mM (E) e trealose 100mM (T).....	78
Figura 5. Cinética espermática pós-descongelamento com BTS (B) e três antioxidantes combinados entre si, ácido ascórbico 1mM (C), α -tocoferol 0,1mM (E) e trealose 100mM (T).....	79
Figura 6. Viabilidade celular pós-descongelamento com BTS (B) e três antioxidantes combinados entre si, ácido ascórbico 1mM (C), α -tocoferol 0,1mM (E) e trealose 100mM(T)	80

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	1
REVISÃO DE LITERATURA	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Panorama da aquicultura	5
3.2 Estrutura dos espermatozoides de peixes	6
3.3 Motilidade espermática	8
3.4 Soluções ativadoras	9
3.5 Soluções diluidoras	10
3.6 Agentes crioprotetores	12
3.7 Uso de antioxidantes	13
3.8 Congelamento e descongelamento do sêmen	16
3.9 Avaliação da qualidade do sêmen pós-descongelamento	17
3.10 Perspectivas e desafios da criopreservação	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 2	28
ULTRAESTRUTURA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (<i>Leiarius marmoratus</i>) EM CATIVEIRO	28
1 RESUMO	29
2 ABSTRACT	30
3 INTRODUÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Localização	33
4.2 Seleção dos animais e coleta de sêmen	33
4.3 Avaliação da qualidade do sêmen fresco	34
4.4 Avaliação da ultraestrutura e morfometria espermática	35
4.5 Congelamento do sêmen e diluidores	36
4.6 Descongelamento do sêmen e soluções ativadoras	37
4.7 Análise estatística	38

5 RESULTADOS	39
5.1 Ultraestrutura e morfometria espermática	39
5.2 Qualidade espermática pós-descongelamento	42
6 DISCUSSÃO	45
6.1 Ultraestrutura e morfometria espermática	46
6.2 Soluções diluidoras e qualidade espermática pós-descongelamento	47
7 CONCLUSÃO	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 3	56
EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E CRIOPROTETORES NO CONGELAMENTO ...	56
DE SÊMEN DE PINTADO (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>)	56
1 RESUMO	57
2 ABSTRACT	58
3 INTRODUÇÃO	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1 Localização	62
4.2 Seleção dos animais e coleta de sêmen	62
4.3 Avaliação da qualidade do sêmen fresco	63
4.4 Experimento 1 - Crioprotetores permeáveis	63
4.5 Experimento 2 - Antioxidantes não-enzimáticos	65
4.6 Congelamento e descongelamento do sêmen	66
4.7 Análise objetiva da motilidade espermática	67
4.8 Análise da viabilidade celular por sondas fluorescentes	68
4.9 Análise estatística	69
5 RESULTADOS	70
5.1 Experimento 1	70
5.2 Experimento 2	75
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

RESUMO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus*) E PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

Autor: Adalmyr Moraes Borges

Orientador: Rodrigo Diana Navarro

Coorientador: Ivo Pivato

Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, Brasília-DF.

O estudo buscou avaliar diferentes alternativas para o congelamento do sêmen de jundiá amazônico e de pintado e a melhoria da qualidade pós-descongelamento, contribuindo para o desenvolvimento de protocolos para as duas espécies. Entre as abordagens avaliadas foram: (1) a caracterização morfológica dos espermatozoides de jundiá amazônico com o uso de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão; (2) a utilização de diferentes agentes crioprotetores, para o jundiá amazônico: metanol, dimetilsulfóxido e etilenoglicol a 10%, associados a solução de glicose a 5% e para o pintado: metanol, dimetilsulfóxido e dimetilacetamida a 5%, 7,5% e 10%, associados a solução de BTS a 5%; e (3) a adição de substâncias antioxidantes nos meios de congelamento para o pintado: trealose 100 mM, ácido ascórbico 1 mM e α -tocoferol 0,1 mM. Para ambas espécies, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e congelado em vapor de nitrogênio, utilizando botijão *dry shipper*, e descongelado a 40°C por 12 segundos. No jundiá amazônico, o espermatozoide apresentou o comprimento total de $25,46 \pm 2,54 \mu\text{m}$, cabeça esférica ($1,51 \pm 0,18 \mu\text{m}$) ausência de acrossoma, peça intermediária de formato cônico, ligeiramente assimétrica com presença de vesículas, e comprimento de $0,93 \pm 0,17 \mu\text{m}$, e flagelo com arranjo típico e comprimento de $21,48 \pm 2,45 \mu\text{m}$. O sêmen descongelado apresentou valores mais altos ($p < 0,05$) para duração, vigor e taxa de motilidade espermática com os crioprotetores metanol 10% e dimetilsulfóxido 10% quando comparado com o etilenoglicol 10%. No pintado, o sêmen criopreservado com metanol 7,5% e 10% apresentou valores para duração e taxa de motilidade maiores ($p < 0,05$) comparado com o dimetilsulfóxido e dimetilacetamida. O tratamento com os três antioxidantes associados proporcionou taxa de motilidade maior ($p < 0,05$) em relação ao tratamento sem antioxidantes. Para os parâmetros de duração e taxa de motilidade foi observada interação significativa ($p < 0,05$) entre o ácido ascórbico e o α -tocoferol. Assim, os resultados obtidos na criopreservação de sêmen de jundiá amazônico não foram suficientes para estabelecer um protocolo para a espécie. Na criopreservação de sêmen de pintado é recomendado o uso do metanol a 7,5% associado à solução de BTS a 5%, e a adição conjunta dos antioxidantes trealose (100mM), ácido ascórbico (1mM) e α -tocoferol (0,1mM).

Palavras chaves: siluriforme, congelamento, espermatozoide, ultraestrutura, crioprotetor, antioxidante.

ABSTRACT

SEMEN CRYOPRESERVATION OF AMAZON CATFISH (*Leiarius marmoratus*) AND SPOTTED CATFISH (*Pseudoplatystoma corruscans*)

Author: Adalmyr Morais Borges

Advisor: Rodrigo Diana Navarro

Co-advisor: Ivo Pivato

College of Agronomy and Veterinary Medicine - University of Brasilia, DF.

This study aimed to evaluate different alternatives for the semen freezing of amazon catfish and spotted catfish, contributing to the development of protocols for both species increasing the process efficiency in both species. Among the approaches used are (1) morphological characterization of amazon catfish spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy; (2) use of different cryoprotectant agents, 10% methanol, dimethylsulfoxide and ethyleneglycol, associated 5% glucose solution in amazon catfish, and 5%, 7,5% e 10%, methanol, dimethylsulfoxide and dimethyacetamide, associated 5% BTS solution in spotted catfish; and (3) addition of antioxidants in the freezing media, trehalose (100 mM), ascorbic acid (1 mM) and α -tocopherol (0.1 mM) in spotted catfish. In both especies, semen samples were loaded in 0.25 mL plastic straws, frozen in nitrogen vapour (dry shipper) and thawed at 40°C for 12 seconds. In the amazon catfish, fresh spermatozoon was 25.46 ± 2.54 μ m long, head was spherical (1.51 ± 0.18 μ m) with no acrosome, midpiece was coneshapped with presence of vesicles, slightly asymmetric, 0.93 ± 0.17 μ m long and the single fagellum was 21.48 ± 2.45 μ m long with the typical arrangement. Post-thawed semen presented higher values ($p < 0.05$) for duration, vigor and sperm motility rate with cryoprotectants 10% methanol and 10% DMSO, when compared to 10% ethyleneglycol. In the spotted catfish, the cryopreserved semen with 7,5% and 10% methanol presented higher values ($p < 0.05$) for latency time and motility rate compared to dimethylsulfoxide and dimethyacetamide. The treatment with associated antioxidants provided a higher motility rate ($p < 0.05$) compared to the antioxidant-free treatment. For the parameters of latency time and motility rate, a significant interaction ($p < 0.05$) was observed between ascorbic acid and α -tocopherol. In conclusion, the results observed in semen cryopreservation of amazon catfish were not satisfactory to establish a protocol for the specie. For the semen cryopreservation of spotted catfish, it is recommended the use of 7.5% methanol with the 5% BTS solution and the addition of the antioxidants trehalose (100 mM), ascorbic acid (1 mM) and α -tocopherol (0.1 mM).

Keywords: siluriform, freezing, espermatozoon, ultrastructure, cryoprotectant, antioxidant.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

O jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) são peixes siluriformes da família *Pimelodidae*, nativos das bacias, respectivamente, dos rios Amazonas e Orinoco, e dos rios São Francisco e Paraná. Esses peixes, conhecidos como grandes bagres, possuem grande importância no desenvolvimento da aquicultura nacional, sendo utilizados principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste (SAINT-PAUL, 2017).

Quanto à reprodução, são espécies reofilicas, sendo que a produção de formas jovens é feita por meio da reprodução artificial, onde para a obtenção dos gametas é necessário a utilização de indução hormonal (BRITO e BAZZOLI, 2003; MIRA LOPEZ et al., 2010; ARAÚJO et al. 2014; BARZOTTO et al., 2017). Nesse sentido, a criopreservação do sêmen é uma alternativa que pode ser utilizada para a otimização da reprodução e preservação de ambas as espécies (CAROLSFELD et al., 2003; VIVEIROS, 2011; MURGAS et al., 2014).

A criopreservação é um processo que permite o armazenamento dos gametas em temperaturas extremamente baixas, geralmente em nitrogênio líquido a -196°C , preservando a viabilidade estrutural e funcional por longos períodos (JANG et al., 2017). As principais vantagens da criopreservação do sêmen de peixes são: conservação da variabilidade genética (bancos de germoplasma); sincronização dos reprodutores na disponibilidade de sêmen; facilidade no transporte entre propriedades; redução de custos com a manutenção dos machos; aumento da vida útil dos reprodutores; disponibilidade de sêmen em períodos menos favoráveis; ampliação de programas de melhoramento genético; e a possibilidade de comercialização de sêmen (TORRES et al., 2016; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017).

Os protocolos de criopreservação de sêmen estão sendo desenvolvidos para várias espécies, em especial para as famílias *Characidae*, *Prochilodontidae*, *Anastomidae*, *Pimelodidae*, *Siluridae*, *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Centropomidae*, *Epinephelidae* e *Lutjanidae* (ASTURIANO et al., 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017). No entanto, com exceção de duas espécies: a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), ainda existe uma dificuldade no estabelecimento de protocolos para as demais espécies de peixes (MURGAS et al., 2014; GARCIA et al., 2016).

A biotecnologia da criopreservação de sêmen em espécies nativas poderá atender tanto as demandas de melhoramento genético para as características de interesse na piscicultura comercial, como os aspectos da preservação ambiental e conservação de recursos genéticos de espécies de peixes ameaçadas. Para isso, devido às diferenças fisiológicas observadas nas diferentes espécies, devem ser padronizados protocolos espécie-específicos para os peixes de interesse econômico e ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes alternativas para a criopreservação de sêmen do jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), criados em cativeiro, buscando a melhoria da qualidade do sêmen pós-descongelamento.

2.2 Objetivos específicos

1. Descrever as características espermáticas e a ultraestrutura do sêmen de jundiá amazônico, identificando a presença das principais estruturas celulares e os principais efeitos do congelamento e descongelamento;
2. Avaliar a eficiência de meios de congelamento a base de glicose a 5% associados aos agentes crioprotetores: dimetilsulfóxido a 10%, etilenoglicol a 10% e metanol a 10%, na criopreservação do sêmen de jundiá amazônico;
3. Avaliar os efeitos de diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%) dos agentes crioprotetores: dimetilacetamida, dimetilsulfóxido e metanol, na criopreservação do sêmen de pintado;
4. Avaliar os efeitos da adição de agentes antioxidantes: trealose (100mM), ácido ascórbico (1mM) e α -tocoferol (0,1mM), na melhoria da qualidade pós-descongelamento do sêmen de pintado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Panorama da aquicultura

A aquicultura tem demonstrado a sua importância econômica no cenário mundial. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO (2016), a produção mundial de pescado em 2014 foi de 167 milhões de toneladas sendo que a produção da aquicultura (74 milhões de toneladas) está quase igualando-se à produção originada pela pesca (93 milhões de toneladas). O comércio internacional de proteína de origem animal é outro fator de destaque, onde o pescado é responsável por um terço do valor das exportações, valor acima das participações individuais de suínos, aves e bovinos (FAO, 2016).

No Brasil, a produção de peixes de água doce ainda é pequena. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2017), a produção total da piscicultura nacional foi de aproximadamente 500 mil toneladas em 2016. No entanto, o país possui um dos maiores potenciais para a produção de peixes em cativeiro, principalmente devido à disponibilidade de água doce e presença de grandes reservatórios de usinas hidrelétricas (SAINT-PAUL, 2017).

As espécies nativas vêm crescendo em importância na criação de peixes em cativeiro, e respondem por 40% do total de pescado nacional produzido (SAINT-PAUL, 2017). O valor da produção nacional em cativeiro dos surubins, conhecidos como grandes bagres: jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos, ocupa o quarto lugar, atrás apenas da tilápia (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), e peixes redondos híbridos (IBGE, 2016).

A utilização de peixes híbridos é muito comum na produção aquícola com a finalidade de facilitar o processo de reprodução e larvicultura, e obter formas jovens com características mais favoráveis à criação em cativeiro, favorecendo com isso o aumento da produtividade e a redução de custos (CRUZ-CASALLAS et al., 2011; BERNARDES et al., 2016). Por outro lado, o manejo inadequado dos peixes híbridos tem causado a contaminação genética, podendo ameaçar a integridade genética das populações naturais e em cativeiro (HASHIMOTO et al., 2012; RODRIGUEZ-PULIDO et al., 2016; YABU et al., 2018).

A situação observada demanda esforços de pesquisa que possibilitem a criação de bancos de germoplasma, com a definição de estratégias para a conservação dos gametas a longo prazo (TORRES et al., 2016; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017). A criopreservação do sêmen pode prevenir a erosão genética com a conservação de recursos genéticos das espécies ameaçadas, tanto para o melhoramento genético, com aplicação prática nas fazendas de aquicultura, como para preservação ambiental, com a manutenção da variabilidade genética nos estoques naturais (CAROLSFELD et al., 2003; GARCIA et al., 2016).

3.2 Estrutura dos espermatozoides de peixes

Os espermatozoides dos peixes teleósteos são pequenos e de estrutura bem simples, classificados como tipo “aquasperm”, e subdivididos em: cabeça, que contém o núcleo de cromatina compactada; peça intermediária, com mitocôndrias que atuam na produção de energia; e cauda, que atua na motilidade (LAHNSTEINER e PATZNER, 2008, BOBE e LABBÉ, 2010; MELO et al., 2017). O comprimento dos espermatozoides varia de 25 a 100 μm e a largura da cabeça varia em torno de 2 μm na sua região média (LAHNSTEINER e PATZNER, 2008).

A ausência do acrossoma observada na maioria dos peixes teleósteos, pode ser explicada pela presença de uma micrópila por oócito. Nos peixes neotropicais, o orifício da micrópila possui um diâmetro compatível com as dimensões da cabeça dos espermatozoides, e permite a entrada de um único gameta (MURGAS et al., 2017).

Nos peixes siluriformes de fecundação externa, os espermatozoides são bem semelhantes, com cabeça pequena de formato esférico ou ovoide, com

ausência de acrossoma, peça intermediária de formato variável, podendo apresentar vesículas ou não, e a cauda uniflagelada (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008). De acordo com as características observadas, os espermatozoides também são classificados como tipo “aquasperm” primitivos (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008; MELO et al., 2017).

A morfologia da cabeça dos espermatozoides está relacionada à estratégia reprodutiva da fecundação em cada espécie (MURGAS et al., 2017). Sendo que nos peixes siluriformes, Melo et al. (2011) descrevem que os formatos arredondado ou esférico estão presentes nos peixes de fecundação externa em ambientes pelágicos ou demersais, como no pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), mandi (*Pimelodus maculatus*), pirá-tamanduá (*Conorhynchus conirostris*), pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e cascudo preto (*Rhinelepis aspera*), enquanto que o formato alongado está presente nos peixes de fecundação interna, como no bagre anujá (*Trachelyopterus galeatus*).

Na análise da estrutura interna da cabeça dos espermatozoides de peixes siluriformes, da família Pimelodidae, foram observadas a ausência da fossa nuclear e de canais citoplasmáticos, que são características singulares decorrentes da espermiogênese tipo III, observada nessa família (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008). Nesse tipo de espermiogênese, o núcleo não sofre rotação e o eixo da cauda mantém-se em posição central em relação ao núcleo (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008; MELO et al., 2017).

A peça intermediária apresenta formato de acordo com as espécies de peixes, desde cilíndricas, bem definidas e simétricas nos peixes caraciformes, até cônicas, envolvendo a base da cabeça e assimétricas nos peixes siluriformes (VIVEIROS et al., 2012; MELO et al., 2017; MURGAS et al., 2017). A presença de mitocôndrias pode ser única, como nos salmonídeos, ou variar de duas a nove, nas demais espécies, dispostas em forma de anel ao longo da peça intermediária (LAHNSTEINER e PATZNER, 2008; ULLOA-RODRÍGUEZ et al., 2017).

A cauda ou flagelo consiste de uma fina estrutura cilíndrica que inicia na base do núcleo do espermatozoide, com comprimento variando de 25 a 100 µm, e diâmetro de 0,4 a 1 µm, contendo no seu interior o axonema que é a principal estrutura responsável pela motilidade (LAHNSTEINER e PATZNER, 2008; COSSON, 2010). O axonema possui um arranjo típico (9+2) formado por nove pares

de microtúbulos periféricos e um par central (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008; VIVEIROS et al., 2012).

3.3 Motilidade espermática

Diferente dos animais terrestres, os espermatozoides dos peixes estão imóveis no plasma seminal e nas gônadas (ALAVI e COSSON, 2006; COSSON, 2010). A motilidade é induzida após a espermiacção, quando os espermatozoides entram em contato com o meio aquático, durante a reprodução natural, ou com soluções específicas na reprodução artificial. (FIGUEROA et al., 2014; COSSON, 2016). O início e a duração da motilidade estão relacionados com a composição do plasma seminal e a osmolaridade do meio (ALAVI e COSSON, 2006). A osmolaridade do plasma seminal dos peixes de água doce apresenta em média 300mOsm, sendo que a ativação do movimento ocorre em condições hiposmóticas (BROWNE et al., 2015).

O início da motilidade está relacionado com a permeabilidade da membrana celular, e a ativação de canais de íons e aquaporinas, aumentando a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), sendo que a via de AMPc determina a ativação de proteínas flagelares por fosforilação e desfosforilação (ZILLI et al., 2011). Inicialmente as velocidades espermáticas são mais altas, e vão reduzindo gradativamente, situação essa decorrente do gasto de trifosfato de adenosina (ATP), fonte de energia para a manutenção do movimento flagelar (COSSON, 2010; COSSON, 2016).

Além da velocidade, a duração da motilidade também está relacionada com a energia armazenada nos espermatozoides, sendo que o consumo inicial de energia não consegue ser suprido pela produção de ATP na mitocôndria (COSSON, 2010; DZYUBA et al., 2017). Nos peixes de água doce, a duração da motilidade está limitada a períodos curtos, de 30 segundos até alguns minutos, com variações entre as diferentes espécies (BROWNE et al., 2015).

O número de mitocôndrias e o comprimento do flagelo poderiam explicar a causa das diferenças na duração da motilidade entre as espécies (ALAVI e COSSON, 2006; BOBE e LABBÉ, 2010). No entanto, segundo Murgas et al. (2017), ainda não está bem clara a correlação das estruturas com a intensidade e

duração da motilidade espermática.

A capacidade do espermatozoide alcançar e fecundar o oócito deve ser considerada como um dos principais parâmetros na avaliação da qualidade do sêmen (RURANGWA et al., 2004; BOBE e LABBÉ, 2010). Assim, é indicado o uso de soluções osmóticas balanceadas com substratos que possam favorecer o início e manutenção da motilidade nos espermatozoides (ALAVI e COSSON, 2006; ADAMES et al., 2015).

3.4 Soluções ativadoras

As soluções ativadoras podem melhorar a intensidade e a duração da motilidade espermática, protegendo as células e aumentando a sua capacidade de fecundação (VIVEIROS et al., 2012; VIVEIROS et al., 2016). O efeito de proteção nos espermatozoides ocorre com a redução dos danos causados pelo choque osmótico que são observados no processo de ativação da motilidade (COSSON, 2010; DZYUBA et al., 2017).

De acordo com Cuadrado et al. (2014), a osmolaridade da solução ativadora é o principal fator com efeitos na taxa e duração da motilidade espermática. A ativação da motilidade pode ser feita com diferentes soluções, variando a sua eficiência de acordo com as espécies de peixes. As soluções ativadoras mais comuns são compostas por bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, sendo que essas soluções podem promover o aumento do tempo e taxa de motilidade em vários peixes nativos (CARNEIRO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS et al., 2016).

A composição iônica do ativador, embora importante, tem menor influência do que a sua osmolaridade (YANG e TIERSCH, 2009). Nesse sentido, as soluções ativadoras não iônicas, a base de açúcares, também são capazes de iniciar a motilidade espermática em peixes, como exemplo, a solução de frutose no jundiá cinza (*Rhandia quelen*), e a solução de glicose no curimbá (*Prochilodus lineatus*) e na piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), que aumentaram a intensidade e duração dos movimentos (GONÇALVES et al., 2013; ADAMES et al., 2015; VIVEIROS et al., 2016).

Para o sêmen criopreservado de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), a solução de NaHCO_3 a 1% apresentou melhores resultados de motilidade do que a solução de NaCl a 0,29% (CAROLSFELD et al., 2003; VELAVERDE, 2013). Em pirapitinga (*Brycon nattereri*), foram testadas soluções de NaCl a 0,29% (80 mOsm) e NaHCO_3 a 1% (220 mOsm), com a taxa de motilidade igual para as duas soluções, e a duração maior com NaHCO_3 a 1% (VIVEIROS et al., 2012). Diferentes concentrações de NaCl (0,3%; 0,6%; 0,9%) e água destilada foram avaliadas para curimba (*Prochilodus lineatus*), com taxas de motilidade e duração maiores para água destilada e NaCl a 0,3% (FELIZARDO et al., 2011).

As soluções de NaCl e de NaHCO_3 , tem apresentado bons resultados em outras espécies nativas, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o dourado (*Salminus brasilienses*), com variações entre as espécies (CAROLSFELD et al., 2003; CARNEIRO et al., 2012; ZANANDREA et al., 2014). As diferenças encontradas entre as espécies foram relacionadas à composição da membrana plasmática, e à resposta das células ao estresse osmótico (BROWNE et al., 2015).

3.5 Soluções diluidoras

Independentemente da espécie, o uso de soluções diluidoras é essencial para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012; GARCIA et al., 2016). As soluções diluidoras ou meios de congelamento são compostos por sais ou açúcares, e devem ser isotônicas para inibir a ativação da motilidade espermática, e ter alta condutividade térmica para transferência rápida de temperatura (VIVEIROS et al., 2015; MURGAS et al., 2014). Além disso, devem ser estáveis, fornecer nutrientes e apresentar ambiente compatível com a composição do plasma seminal dos peixes (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

Para os peixes nativos, a primeira solução diluidora utilizada foi composta apenas por uma solução salina de NaCl (COSER et al., 1984). Dentre as várias soluções avaliadas como diluidores de sêmen de peixes, as mais frequentes são as soluções isotônicas simples de glicose a 5% ou NaCl a 0,9%, sendo também utilizados meios de congelamento comerciais formulados para uso em sêmen de

mamíferos, como o BTS (*Beltsville Thawing Solution*) desenvolvido para suínos, e o ACP (água de côco em pó) desenvolvido para caprinos (VIVEIROS e GODINHO, 2009; SALMITO-VANDERLEY et al., 2012; MURGAS et al., 2014).

Para o jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) foi relatado o uso de diluidores salinos na preservação de sêmen a curto prazo na temperatura de 4°C (POLEO e MORA, 2008). CAROLSFELD et al. (2003) e Velaverde (2013), descreveram para o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) o uso de soluções de glicose e de BTS, sendo que o uso de soluções salinas não foi eficiente na sua criopreservação.

Diferente da maioria dos peixes de água doce, que necessitam de um açúcar na composição do diluidor, o sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) apresentou melhores resultados com o uso de soluções salinas (LÓPEZ et al., 2015). Em salmonídeos, um estudo avaliou a substituição da glicose por outros açúcares como a trealose e a sacarose, e os efeitos positivos na motilidade foram espécie específicos (NYNCA et al., 2016). Assim, a composição do plasma seminal e o perfil lipídico das membranas plasmáticas influencia na escolha dos diferentes diluidores para cada espécie de peixe (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012a; GARCIA et al., 2016).

As proporções utilizadas na diluição do sêmen podem influenciar na qualidade do sêmen criopreservado e também podem variar de acordo com a espécie e a concentração espermática (VIVEIROS, 2011; NYNCA et al., 2017). Na criopreservação do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), foram utilizadas a proporção de diluição (sêmen:diluidor) de 1:4 (CAROLSFELD et al., 2003; VELAVERDE, 2013). Para algumas espécies nativas, as proporções mais comuns estão na faixa de 1:4 a 1:9 (VIVEIROS e GODINHO, 2009; MURGAS et al., 2014). Estudos em tambaqui (*Colossoma macropomum*) e dourado (*Salminus brasilienses*) indicaram taxas de diluição, respectivamente de 1:9 e 1:27, sem prejuízo para qualidade seminal (CARNEIRO et al., 2012; ZANANDREA et al., 2014).

Recentemente, Nynca et al. (2017) descreveram um protocolo de criopreservação de sêmen de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), no qual a taxa de diluição é variável de acordo com a concentração espermática observada, e semelhante ao que ocorre em bovinos, a solução diluidora é utilizada para ajustar a concentração espermática, com doses exatas por palheta. Esforços semelhantes de

padronização nas demais espécies pode contribuir para a adoção da tecnologia em escala comercial (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017)

3.6 Agentes crioprotetores

As soluções diluidoras também têm a função de serem carreadores de agentes crioprotetores (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012). Os crioprotetores são substâncias que atuam na proteção das células contra os efeitos negativos do processo de congelamento, como a formação de cristais de gelo, o choque osmótico e os danos estruturais nas membranas celulares, mas em concentrações elevadas também podem ser tóxicos (ELLIOTT et al., 2017; JANG et al., 2017).

Quanto à permeabilidade das membranas celulares, os crioprotetores são classificados em permeáveis e não-permeáveis. Os crioprotetores permeáveis conseguem penetrar no interior das células e têm a função de reduzir o ponto crioscópico dos ambientes intracelular e extracelular, reduzindo a formação de microcristais de gelo, enquanto que os crioprotetores não-permeáveis atuam no meio extracelular, estabilizando as membranas plasmáticas e auxiliando na desidratação e hidratação das células (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012; GARCIA et al., 2015; ELLIOTT et al., 2017).

Carolsfeld et al. (2003) indicaram o benefício da associação entre os crioprotetores permeáveis e não-permeáveis na composição de diluidores em algumas espécies de peixes nativos. Sendo que para os peixes nativos são mais comuns como crioprotetores permeáveis: o dimetilsulfóxido (DMSO), o metilglicol, o metanol; e como não-permeáveis: a glicose, a frutose, o leite em pó, a gema de ovo, a água de coco em pó (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012; MURGAS et al., 2014, ADAMES et al., 2015; FELIZARDO et al., 2016).

Em peixes siluriformes, os crioprotetores permeáveis mais frequentes são o metanol, o DMSO, o dimetilacetamida (DMA), geralmente na concentração de 10% (v:v), podendo variar na faixa de 5 a 15% (VIVEIROS, 2011). Para os bagre nativos, em pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), o metanol na concentração de 10% foi mais efetivo do que o DMSO a 10% (CAROLSFELD et al., 2003) e não houve diferenças entre o uso de DMSO ou DMA em 8 e 10% (VELAVERDE, 2013), enquanto que no jundiá cinza (*Rhandia quelen*) o uso de metanol a 10% está

estabelecido com sucesso (ADAMES et al. 2015). Resultados semelhantes foram descritos para o bagre africano (*Clarias gariepinus*), onde o metanol apresentou menor toxidez do que o DMSO, em concentrações acima de 15% (VIVEIROS, 2011).

O metanol possui o menor peso molecular (32g/mol) e por isso a velocidade de permeabilidade celular mais rápida em relação aos demais crioprotetores como DMSO (78g/mol), DMA (87g/mol), metilglicol (76g/mol), etilenoglicol (62g/mol) (ELLIOTT et al., 2017). O metanol também é utilizado em outras espécies, como em tilápias (NAVARRO et al., 2014) e em salmonídeos (NYNCA et al., 2017). No entanto, o DMSO e o metilglicol são os crioprotetores mais utilizados para a maioria das espécies nativas de peixes, com vários registros observados (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012, MURGAS et al., 2014).

Para os peixes nativos, a glicose é o crioprotetor não-permeável mais utilizado, seja em soluções simples a 5% ou em soluções complexas com outros ingredientes como o BTS, associada ou não ao leite em pó ou gema de ovo. No pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), os melhores resultados foram encontrados com soluções de glicose com 5 e 8% associadas ao leite em pó (CAROLSFELD et al., 2003) ou de glicose a 5% associada a gema de ovo (VELAVERDE, 2013), e no jundiá cinza (*Rhandia quelen*) vem sendo utilizada a solução de frutose a 5% (ADAMES et al. 2015).

A glicose atua aumentando a viscosidade do meio, regulando a saída e a entrada de água das células (desidratação e hidratação) durante o congelamento e descongelamento, e protegendo a integridade das membranas dos choques térmico e osmótico. A glicose e a frutose também podem exercer a função nutritiva como fonte de energia para os espermatozoides, sendo que o efeito crioprotetor está relacionado com as concentrações utilizadas (GARCIA et al., 2016; ELLIOTT et al., 2017).

3.7 Uso de antioxidantes

Durante a criopreservação, além do choque térmico e do estresse osmótico, as células espermáticas também sofrem os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos oxidativos às estruturas celulares

(SARASWAT et al., 2016). Quando a produção de EROs é maior que a sua metabolização ocorre o estresse oxidativo, que afeta principalmente a membrana plasmática dos espermatozoides, rica em ácidos graxos poli-insaturados e mais sensível à peroxidação lipídica (BOBE e LABBÉ, 2010; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012a).

O sêmen dos peixes possui sistemas naturais de defesa antioxidante, classificados em enzimáticos: que são compostos por enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx); e não-enzimáticos: com substâncias como as vitaminas C e E, o ácido úrico, a cisteína (LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER et al., 2010; SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ et al., 2013).

No entanto, a diluição do sêmen no processo de criopreservação diminui a concentração dos antioxidantes, reduzindo a ação desses sistemas naturais (SARASWAT et al., 2016). Além disso, esses sistemas antioxidantes do sêmen são lentos e menos eficientes na proteção *in vitro* dos espermatozoides contra os EROs (LAHNSTEINER et al., 2010).

Para superar essas deficiências, a adição de antioxidantes exógenos nos diluidores de sêmen foi avaliada em várias espécies animais, especialmente em bovinos, suínos e equinos. Os efeitos positivos ou negativos dos antioxidantes exógenos variaram entre as espécies e diluidores utilizados, sendo dependentes das concentrações utilizadas (TARIQ et al., 2015).

A função dos antioxidantes não-enzimáticos, principalmente das vitaminas C e E, é a proteção dos efeitos dos EROs nas células espermáticas, prevenindo o início ou quebrando a propagação em cadeia das reações de peroxidação lipídica (NAVARRO et al., 2009). O ácido ascórbico (vitamina C) é um antioxidante hidrossolúvel que além da peroxidação lipídica, combate a oxidação das proteínas e do DNA, e pode regenerar outras moléculas antioxidantes. Enquanto que o α -tocoferol (vitamina E) é um antioxidante lipossolúvel que atua diretamente na proteção dos lipídeos das membranas celulares contra as reações de peroxidação (TARIQ et al., 2015; SARASWAT et al., 2016).

Em sêmen de peixes, os primeiros estudos avaliaram os efeitos em espécies marinhas (CABRITA et al., 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012b), onde

os antioxidantes promoveram tanto o aumento como a redução da motilidade e velocidade espermática, sendo que as menores concentrações de ácido ascórbico (1,0mM) e de α -tocoferol (0,1mM) apresentaram resultados significativamente mais altos. As diferentes concentrações em diferentes espécies podem ser a causa dos resultados diferentes observados (CABRITA et al., 2011).

Avaliações semelhantes foram feitas em peixes de água doce, em curimba (*Prochilodus lineatus*), curimatã (*Prochilodus brevis*), e carpa comum (*Cyprinus carpio*) com vitaminas C e E em concentrações entre 1 e 100 μ g L⁻¹. Os resultados obtidos variaram desde efeitos não significativos, a efeitos positivos com a vitamina C e negativos com a vitamina E, confirmando a relação das variações entre espécies e doses utilizadas (NAVARRO et al., 2014; ALMEIDA-MONTEIRO et al., 2017; LINHARES et al., 2017). Paula et al. (2012), avaliaram os efeitos da vitamina E, nas concentrações de 50mM, 100mM e 250mM, em sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), e não observaram efeitos tóxicos da vitamina E mas não houve influência sobre as taxas de duração e motilidade espermática

Estudos descrevem também os efeitos antioxidantes da trealose, e recomendam a sua adição nos diluidores de sêmen em várias espécies animais, com efeitos positivos na qualidade do sêmen pós-descongelamento (TARIQ et al., 2015). Liu et al. (2015) avaliaram os efeitos da adição de seis antioxidantes na criopreservação de sêmen do pargo vermelho (*Pagrus major*), sendo que a trealose (100mM), a vitamina C (25mM), e a vitamina E (25mM) proporcionaram as maiores motilidades e tempo de vida quando comparado com ausência dos antioxidantes. No entanto, ainda não foi identificado se o mecanismo de ação da trealose é devido a sua ação nas membranas celulares, ou na proteção das enzimas antioxidantes (LIU et al., 2015; TARIQ et al., 2015).

A suplementação dos meios de congelamento com substâncias antioxidantes pode ser recomendada como uma forma de melhorar a qualidade do processo de criopreservação de sêmen de peixes. No entanto, novos estudos são necessários para o melhor entendimento do mecanismo de ação desses antioxidantes na manutenção da estrutura e função espermática em peixes (CABRITA et al., 2011, MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012).

3.8 Congelamento e descongelamento do sêmen

Após a etapa de diluição e acondicionamento do sêmen, as amostras são submetidas à diminuição gradual de temperatura, até serem diretamente armazenadas em nitrogênio líquido (MURGAS et al., 2014; GARCIA et al., 2016). O controle da temperatura é essencial para a definição do tamanho e localização dos cristais de gelo formados durante o resfriamento das amostras, minimizando os seus efeitos negativos sobre as membranas e estruturas celulares (JANG et al., 2017).

No congelamento de sêmen de peixes nativos, os equipamentos mais utilizados têm sido os botijões criogênicos de vapor de nitrogênio (*dry shipper*), e as caixas térmicas de poliestireno, e em menor escala estão as máquinas de congelamento programável (VIVEIROS e GODINHO, 2009; MURGAS et al., 2014). Na utilização do *dry shipper* e de caixas térmicas, o controle de temperatura é menos estável, o sêmen é mantido em contato com o vapor de nitrogênio, no primeiro estágio, e em seguida, no segundo estágio é mergulhado diretamente em nitrogênio líquido (CAROLSFELD et al., 2003; VIVEIROS e GODINHO, 2009; VARELA et al., 2015). As taxas de congelamento variam entre -10 a -50°C por minuto com estabilização entre cinco a dez minutos à temperaturas abaixo de -180°C (VIVEIROS et al., 2012; MURGAS et al., 2014).

A utilização de máquina de congelamento programável possibilita o melhor controle da temperatura em três ou dois estágios, com períodos de estabilização entre eles. Assim, permite o ajuste mais preciso da temperatura em cada etapa de acordo com a melhor curva de congelamento para cada espécie, além de congelar um número maior de palhetas (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

Estudos realizados em tambaqui (*Colossoma macropomum*) e em curimatã (*Prochilodus brevis*), compararam a eficiência entre a máquina de congelamento programável e o *dry shipper*, indicando não haver diferenças sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento (CARNEIRO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016). No entanto, em estudo que comparou as metodologias de congelamento com caixa térmica e com *dry shipper*, em sêmen de esturjão (*Acipenser ruthenus*), Horokhovatskyi et al. (2017), recomendaram ser essencial a padronização no uso dos equipamentos, como as dimensões das caixas, o número de palhetas por lote, e a posição e altura das palhetas.

O controle da temperatura também é importante durante o descongelamento, para prevenir a recristalização e a nova formação de microcristais de gelo que podem ser letais para as células (JANG et al., 2017). Os métodos de descongelamento variam de acordo com o volume dos recipientes utilizados, sendo que para palhetas plásticas entre 0,5 e 0,25 mL o descongelamento geralmente é feito em banho de água aquecida, em taxas entre 60°C por 8 segundos ou 40°C por 12 segundos (MURGAS et al., 2014; GARCIA et al., 2016).

3.9 Avaliação da qualidade do sêmen pós-descongelamento

Na avaliação do sêmen criopreservado, a análise subjetiva da motilidade espermática com o uso de microscópio óptico ainda é o principal parâmetro analisado, e isso pode ser a fonte da variação encontrada em diferentes resultados com a mesma espécie (MARTÍNEZ-PARAMO et al., 2017). Apesar da análise subjetiva ser a técnica mais acessível para atividades de campo, as análises objetivas complementares podem auxiliar na padronização e definição de protocolos mais eficientes (CABRITA et al., 2014; GARCIA et al., 2016).

A análise de sêmen computadorizada (CASA) é uma técnica que permite uma avaliação objetiva da motilidade espermática, fornecendo informações adicionais sobre a cinética e velocidade espermática (RURANGWA et al., 2004). Mas ainda existe uma variação de resultados entre os sistemas de CASA utilizados para sêmen de peixes, o que dificulta a comparação entre os estudos realizados com equipamentos diferentes (BORYSHPOLETS et al., 2013). Por outro lado, o sistema CASA atende a uma limitação específica nos peixes que é o curto período em que os espermatozoides se mantêm em movimento, e a alta frequência do batimento flagelar após a ativação (RURANGWA et al., 2001, COSSON, 2010).

A utilização do sistema CASA em peixes nativos, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), curimba (*Prochilodus lineatus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e jundiá cinza (*Rhandia quelen*), está tornando-se mais comum (LÓPEZ et al., 2015; VARELA et al., 2015; VIVEIROS et al., 2016; GOES et al., 2017). No entanto, na avaliação do sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), o sistema CASA foi pouco utilizado e as informações sobre os parâmetros de configuração são

pequenas (MEDINA ROBLES et al., 2008; MIRA LOPEZ et al., 2010; VELAVERDE, 2013; ARAÚJO et al., 2014).

As alterações morfológicas nos espermatozoides estão relacionadas à ruptura das membranas, e a degeneração ou quebra dos axonemas, podendo interferir na sua capacidade de movimentação e de fecundação (BOBE e LABBÉ, 2010; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012). Para o sêmen criopreservado em peixes, os defeitos morfológicos podem ser visualizados em microscópio ótico, sendo classificados em primários, causados pelo manuseio, e pelo congelamento e descongelamento; e secundários, com origem na espermatogênese (MILIORINI et al., 2011).

A utilização de equipamentos de citometria de fluxo com sondas fluorescentes específicas é mais recente, apresentando as vantagens de avaliação simultânea de vários parâmetros e o número grande de células por análise (CABRITA et al., 2014; TRIGO et al., 2015; TORRES e TIERSCH, 2016). Nos peixes nativos como tambaqui (*Colossoma macropomum*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*), os marcadores para integridade da membrana plasmática, potencial das mitocôndria e integridade da cromatina, vem sendo estudados na avaliação da qualidade do sêmen criopreservado (GARCIA et al., 2015; VARELA et al., 2015; VIVEIROS et al., 2015). Quanto ao jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) e ao pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), ainda não foi registrada a aplicação da tecnologia na avaliação do sêmen fresco ou criopreservado nessas espécies.

A utilização do CASA e das sondas fluorescentes tem auxiliado na definição de protocolos para algumas espécies, como a escolha do metilglicol como melhor crioprotetor permeável para curimba (*Prochilodus lineatus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com taxas de motilidade, respectivamente de 63 e 72%, e de células viáveis, respectivamente de 57 e 68% (VIVEIROS et al., 2015). Em tambaqui (*Colossoma macropomum*), os crioprotetores DMSO e dimetilformamida (DMF) foram escolhidos, apresentando taxas de motilidade e de células viáveis de 50%, e mesmo com parte dos espermatozoides danificados, as taxas de fecundação (91%) e de eclosão (87%) não foram afetadas pelo congelamento (VARELA et al., 2012; VARELA et al., 2015).

3.10 Perspectivas e desafios da criopreservação

Uma situação frequente nas pesquisas sobre criopreservação de sêmen de peixes é a ausência de padronização para cada etapa do processo. Esse é um dos principais fatores que limita o uso comercial da biotecnologia na cadeia produtiva da aquicultura (TORRES et al., 2016; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017).

A avaliação da qualidade do sêmen em conjunto com o aperfeiçoamento e padronização das etapas do processo de congelamento e descongelamento são essenciais para reduzir a variação observada nos resultados entre as várias espécies de peixes (CABRITA et al., 2014). Assim será possível identificar os fatores mais importantes que poderão contribuir para a melhoria da qualidade do sêmen pós-descongelamento (GARCIA et al., 2016; ASTURIANO et al., 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, M. S.; DE TOLEDO, C. P.; NEUMANN, G.; BUZZI, A. H.; BURATTO, C. N.; PIANA, P. A.; BOMBARDELLI, R. A. Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 119-28, 2015.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.

ARAÚJO, J. E. X. S.; STREIT JR, D. P.; RIBEIRO, J. S. A.; MARTINS, E. F. F.; SOUZA, F. N.; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A. Ovipel and carp pituitary extract as spawning inducers in males of the Amazon Catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 882-886, 2014.

ASTURIANO, J. F., CABRITA, E., HORVATH, A., 2016. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v.245, p.69-76, 2017.

BARZOTTO, E.; OLIVEIRA, M.; MATEUS, L. Reproductive biology of *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz, 1829) and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann and Eigenmann, 1889), two species of fisheries importance in the Cuiabá River Basin, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 33, 29-36, 2017.

BERNARDES, C. L.; NAVARRO, R. D.; GUERRA-SANTOS, B.; FORTES-SILVA, R. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth, body composition, and nutrient utilization of hybrid catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 29, p. 58-65, 2016.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 535-548, 2010.

BORYSHPOLETS, S.; KOWALSKI, R. K.; DIETRICH, G. J.; DZYUBA, B.; CIERESZKO, A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 80, p. 758-765, 2013.

BRITO, M.F.G; BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 624-633, 2003.

BROWNE, R. K.; KAUROVA, S. A.; UTESHEV, V. K.; SHISHOVA, N. V.; MCGINNITY, D.; FIGIEL, C. R.; MANSOUR, N.; AGNEW, D.; WU, M.; GAKHOVA, E. N.; DZYUBA, B.; COSSON, J. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 1-13, 2015.

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

CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; GAVAIA, P. J.; RIESCO, M. F.; VALCARCE, D. G.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P.; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389-401, 2014.

CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; MARIA A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, v. 33, n. 3, p. 285-393, 2012.

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

COSER, A. M.; GODINHO, H; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 240-279, 2010.

COSSON, J. Flagella parameters used as descriptors of fish spermatozoa motility. **Animal Reproduction. Science**, v. 169, p. 128-129, 2016.

CRUZ-CASALLAS, P. E; MEDINA-ROBLES, V. M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Fish farming of native species in Colombia: current situation and perspectives. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 823-831, 2011.

CUADRADO, E. E. H.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, E. S. Extension of sperm motility leads to increased rates of fertilization and hatching in curimba, *Prochilodus lineatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, n. 2, p. 329-333, 2014.

DZYUBA, B.; BONDARENKO, O.; FEDOROV, P.; GAZO, I.; PROKOPCHUK, G.; COSSON, J. Energetics of fish spermatozoa: the proven and the possible. **Aquaculture**, v. 472, p. 60-72, 2017.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, 74-91, 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Food and Agriculture Organization, Rome, 2016. p. 200.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; NAVARRO, R. D.; GONÇALVES, A. C. S.; PAULINO, M. S. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, v. 60, p. 1255-1262, 2011.

FELIZARDO, V. O.; MELO, C. C. V.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, C. S.; NAVARRO, R. D.; FREITAS, R. T. F. Optimization of artificial propagation in piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*) using criopreserved sêmen. **Cryoletters**, v. 37, n. 5, p. 330-334, 2016.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J. G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquaculture Research**, 2014.

GARCIA, R. R. F.; VASCONCELOS, A. C. N.; POVH, J. A.; OBERST, E. R.; VARELA JR., A. S.; CORCINI, C. D.; STREIT JR., D. P. Functional integrity of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 599-606, 2015.

GARCIA, R. F.; STREIT JR., D. P.; CABRITA, E.; GODOY, L. C. Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges, In: **Cryopreservation in Eukaryotes**. InTech, 2016 p. 57-73.

GONÇALVES, A.C.S.; 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 Reproduction**, v.10, n.1, p. 62-70, 2013.

GOES, M. D.; REIS GOES, E. S.; RIBEIRO R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; CASTRO P. L.; BIGNOTTO T. S.; BOMBARDELLI, R. A. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: Reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology**, v, 88, p. 254-263, 2017.

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

HOROKHOVATSKYI, Y.; RODINA, M.; ASYABAR, H. D.; BORYSHPOLETS, S.; DZYUBA, B. Consequences of uncontrolled cooling during sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm cryopreservation on post-thaw motility and fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 95, p. 89-95, 2017.

IBGE. Visão geral da aquicultura brasileira em 2016. **Produção Pecuária Municipal**, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 44, p.1-51, 2017.

JANG, T. H.; PARK, S. C.; YANG, J. H.; KIM, J. Y.; SEOK, J. H.; PARK, U. S.; HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. Sperm morphology and ultrastructure. In: ALAVI, S. M. H.; COSSON, J.; COWARD, K.; RAFIEE, G. (Eds.). **Fish Spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 1-61.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, v. 307, p. 130-140, 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, C. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 314-321, 2010.

LINHARES, F. R. A.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; NUNES, J. F.; CARVALHO M. A. M.; CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Efeito de vitaminas adicionadas ao diluente ACP-104 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 980-988, 2017.

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

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**, v. 31, n. s1, p. 114-118, 2015.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, v. 131, p. 211-218, 2012a.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; HERRÁEZ, M. P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 1129-1136, 2012b.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HORVÁTH, A.; LABBÉ, C.; ZHANG, T.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P.; SUQUET, M.; ADAMS, S.; VIVEIROS, A.; TIERSCH, T. R.; CABRITA, E. Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, v. 472, p. 156-177, 2017.

MEDINA ROBLES, V.M.; MIRA LOPEZ, T.M; RAMÍREZ MERLANO, J.A.; OTERO PATERNINA, A.M.; ZAPATA, B.B.E.; CRUZ CASSALLAS, P.E. Efectos de diferentes inductores hormonales sobre la movilidad y velocidad espermática del yaque (*Leiarius marmoratus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 21, p. 515, 2008.

MELO, R. M. C.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; DOS SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Morphology**, v. 272, n.5, p. 525-535, 2011.

MELO, R. M. C.; GOMES, D. D.; MOREIRA, D. P.; GOMES, M. R.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. **Journal of Morphology**, v.278, p. 170-181, 2017.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; COSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177- 187, 2011.

MIRA LOPEZ, T.M.; MEDINA, R.V.M.; CRUZ, C.P.E. Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. **Revista MVZ Córdoba**, v. 15, n. 2, p. 2070-2077, 2010.

MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; ANDRADE, E. S.; FERREIRA, M. R.; PAULA, D. A. J.; CARVALHO, A. F. S. Cryopreservation of Sperm in Brazilian Migratory Freshwater Fish, In: Dr. Hideaki Yamashiro (Ed.). **Recent Advances in Cryopreservation**. InTech, 2014. p. 59-71.

MURGAS, L. D. S.; PAULINO, M. S.; PALHARES, P. C.; MILIORINI, A. B.; ALVES, E.; FELIZARDO, V. O. Ultrastructural and morphometric analysis of gametes in Neotropical teleost fishes. **Journal of FisheriesSciences.com**, v. 11, n. 1, p. 56-61, 2017.

NAVARRO, R. D.; RIBEIRO FILHO, O. P.; FERREIRA, W. M.; PEREIRA, F. K. S. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 33, n. 1, p. 20-25, 2009.

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 Technology**, v. 36, n. 3, p. 399-404, 2014.

NYNCA, J.; JUDYCKA, S.; LISZEWSKA, E.; DOBOSZ, S.; GRUDNIEWSKA, J.; ARAI, K.; FUJIMOTO, T.; CIERESZKO, A. Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species. **Aquaculture**, v. 464, p. 340-348, 2016.

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**, v. 477, p. 23-27, 2017.

OLIVEIRA, O. M. S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NUNES, L. T.; LINHARES, F. R. A.; PINHEIRO, J. P. S.; PINHEIRO, R. R. R.; FERREIRA, F. O.; CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Cryopreservation of tambaqui semen using a dry shipper and a programmed freezing machine. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 2167-2180, 2016.

PAULA, D. A. J.; ANDRADE, E. S.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; WINKALER, E. U.; ZEVIANI, W.; FREITAS, R. T. F. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 661-665, 2012.

PINHEIRO, J. P.S.; MELO-MACIEL, M. A. P.; LINHARES, F. R. A., LOPES, J. T.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; PINHEIRO, R. R. R.; TORRES, T.M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Use of glucose or BTS combined with DMSO or methylglycol under two different freezing protocols for the cryopreservation of sperm from the common curimatã (*Prochilodus brevis*). **Animal Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 779-786, 2016.

POLEO, G.A; MORA, J.A. Ensayos preliminares de preservación a corto plazo de semen de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontesi*). **Ciencia**, Maracaibo, v. 16, n. 4, p. 396-401, 2008.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii). **Zoologischer Anzeiger**, v. 247, p. 55-66, 2008.

RODRIGUEZ-PULIDO, J. A.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; GONGORA-ORJUELA, A. Hibridización de silúridos: una alternativa para la piscicultura con alto riesgo para la conservación de las especies nativas. **Orinoquia**, v. 20, n.1, p. 62-68, 2016.

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**, v. 55, p. 751-69, 2001.

RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 1-28, 2004.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5, n.1, p.1-9, 2017.

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

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B; PINHEIRO, J. P. S; ALMEIDA, P. S.; LOPES, J. T.; LEITE, L. V.; Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, s. 2, p. 343-350, 2014.

SARASWAT, S.; JINDAL, S. K.; KHARCHE, S. D. Antioxidant and spermatozoa a complex story. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 86, n. 5, p. 495-501, 2016.

SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A.; GAZO, I.; COSSON, J.; LINHART, O. Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, p. 313-320, 2013.

TARIQ, M.; KHAN, M. S.; SHAH, M. G.; NISHA, A. R.; UMER, M.; HASAN, S. M.; RAHMAN, A.; RABBANI, I. Exogenous antioxidants inclusion during semen cryopreservation of farm animals. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 2273-2280, 2015.

TORRES, L.; HU, E.; TIERSCH, T. R. Cryopreservation in fish: current status and pathways to quality assurance and quality control in repository development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1105-1115, 2016.

TORRES, L.; TIERSCH, T. R. Amine reactive dyes: An alternative to estimate membrane integrity in fish sperm cells. **Aquaculture**, v. 463, p. 71-78, 2016.

TRIGO, P.; MERINO, O.; FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. **Andrologia**, v. 4, n. 4, p. 407-411, 2015.

ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; FIGUEROA, E.; DÍAZ, R.; LEE-ESTEVEZ, M.; SHORT S.; FARÍAS, J.G. Mitochondria in teleost spermatozoa. **Mitochondrion**, v. 34, p. 49-55, 2017.

VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLERS, 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**, v. 78, p. 244-251, 2012.

VARELA JUNIOR. A. S.; GOULARTE, K. L.; ALVES, J. P.; PEREIRA, F. A.; SILVA, E. F.; CARDOSO, T. F.; JARDIM, R. D.; STREIT JR, D. P.; CORCINI C. D. Methods of cryopreservation of tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 71-77, 2015.

VELARDE, J. M. C. **Avaliação das características seminais e criopreservação do sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriforme Pimelodidae)**. 2013. 75 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências de São José do Rio Preto, 2013.

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

VIVEIROS, A. T. M. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: TIERSCH, T. R., GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in Aquatic Species**. 2nd. ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2011. p. 387-397.

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

VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; LEAL, M. C.; GONÇALVES, A. C.; ORFÃO, L. H.; COSSON, J. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 193-201, 2015.

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M. C.; FRANÇA, T. S.; ALMEIDA, I. L. G.; ISAU, Z. A.; VERÍSIMO-SILVEIRA, R. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. **Animal Reproduction Science**, 173, p. 73-79, 2016.

YABU, M. H. S.; VIDOTTO-MAGNONI, A. P.; CASIMIRO, A. C. R.; GARCIA, D. A. Z.; COSTA, A. D. A.; PRADO, F. D. D.; PORTO-FORESTI, F.; ORSI, M. L. First record of non-native hybrid catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus* in the Upper Paraná River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 92, n. 1, p. 261-267, 2018.

YANG, H.; TIERSCH T.R. (2009) Sperm motility initiation and duration in a euryhaline fish, medaka (*Oryzias latipes*). **Theriogenology**, v. 72, p. 386-392, 2009.

ZANANDREA, A. C. V.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Use of ACP-104 at different dilutions for sperm cryopreservation of Dourado, *Salminus brasiliensis*. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, p. 82-87, 2014.

ZILLI, L.; BEIRÃO, J.; SCHIAVONE, R.; HERRAEZ, M. P.; CABRITA, E.; STORELLI, C.; VILELLA, S. Aquaporin inhibition changes protein phosphorylation pattern following sperm motility activation in fish. **Theriogenology**, v. 76, p. 737-744, 2011.

CAPÍTULO 2

ULTRAESTRUTURA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus*) EM CATIVEIRO

1 RESUMO

O jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) é um peixe migratório, que ocorre nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, de grande importância econômica e ambiental para o Brasil e outros países sul-americanos. Na aquicultura, o jundiá amazônico é utilizado em cruzamentos interespecíficos e vem aumentando a sua participação na produção de peixes criados em cativeiro, proporcionando altas produtividades sob sistemas intensivos de criação. A conservação de germoplasma de peixes nativos pode ser aprimorada com a técnica de criopreservação do sêmen. O processo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides causa danos celulares e reduz a sua qualidade, por isso protocolos de criopreservação devem ser desenvolvidos para a espécie. Objetivou-se avaliar três agentes crioprotetores (metanol 10%, DMSO 10% e etilenoglicol 10%) e duas soluções ativadoras (NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%). Como diluente foi utilizada uma solução simples de glicose a 5%, sendo o sêmen envasado em palhetas de 0,25 mL e congelado em vapor de nitrogênio, utilizando botijão *dry shipper*. Após seis meses o sêmen foi descongelado e avaliado quanto aos parâmetros de alterações morfológicas, e duração, vigor e taxa de motilidade espermática. Para o sêmen fresco, o espermatozoide apresentou o comprimento total de $25,46 \pm 2,54 \mu\text{m}$, cabeça esférica ($1,51 \pm 0,18 \mu\text{m}$) ausência de acrossoma, a peça intermediária apresentou formato cônico, ligeiramente assimétrica com presença de vesículas, e comprimento de $0,93 \pm 0,17 \mu\text{m}$, o flagelo único apresentou arranjo típico de axonemas (9+2) e comprimento de $21,48 \pm 2,45 \mu\text{m}$. O sêmen descongelado apresentou valores mais altos ($p < 0,05$) para duração, vigor e taxa de motilidade espermática com os crioprotetores metanol 10% e DMSO 10% quando comparado com o etilenoglicol 10%. Diferenças nas alterações morfológicas não foram observadas ($p > 0,05$) entre os tratamentos. A duração da motilidade espermática foi maior ($p < 0,05$) com a ativação com NaHCO₃ 1% (21-96 s) comparada com a ativação com NaCl 0,29% (14-86 s). O sêmen de *Leiarius marmoratus* criopreservado com DMSO e metanol, apresentou respectivamente $7,32 \pm 4,21\%$ e $8,94 \pm 6,69\%$ de taxa de motilidade. No entanto, os resultados não foram satisfatórios para estabelecer um protocolo para a espécie.

Palavras-chave: siluriforme, congelamento, espermatozoide, crioprotetores.

2 ABSTRACT

The amazon catfish (*Leiaris marmoratus*) is a migratory fish that inhabits the basins of the Amazon and Orinoco rivers, with a great economic and environmental importance to Brazil and other South American countries. In the aquaculture, the amazon catfish is used in interspecific crosses and has been increasing its share in the production of fish raised and yielding high rates in intensive systems. The preservation of germplasm of native fish species can be optimized through sperm cryopreservation. The process of spermatozoa freezing and thawing causes cellular damage and reduces sperm quality, so cryopreservation protocols have to be developed to the specie. Cryoprotectant agents (10% methanol, 10% DMSO and 10% ethylene glycol) and activator agents (0.29% NaCl and 1% NaHCO₃) were tested. Glucose 5% basic extender was used as a diluent solution and sperm loaded in 0.25 straws was frozen in nitrogen vapor (dry shipper). Post-thawed sperm motility rate, motility quality, duration of motility and spermatozoon morphology were evaluated after six months. Fresh spermatozoon was 25.46 ± 2.54 μm long, the head was spherical (1.51 ± 0.18 μm) with no acrosome, the midpiece was coneshapped with presence of vesicles, slightly asymmetric, 0.93 ± 0.17 μm long and the single fagellum was 21.48 ± 2.45 μm long with the typical axoneme arrangement (9+2). Post-thawed semen presented higher values ($p < 0.05$) for duration, vigor and sperm motility rate with cryoprotectants 10% methanol and 10% DMSO, when compared to 10% ethylene glycol. Significant differences for spermatozoon morphology were not observed ($p > 0.05$) among treatments. The duration of sperm motility was longer ($p < 0,05$) when triggered in 1% NaHCO₃ (96-21 s) compared 0.29% NaCl (86-14 s). *Leiaris marmoratus* semen cryopreserved with DMSO and methanol, presented respectively $7.32 \pm 4.21\%$ and $8.94 \pm 6.69\%$ of motility. However, the results were not satisfactory to establish a protocol for the specie.

Keywords: siluriform, freezing, spermatozoon, cryoprotectant.

3 INTRODUÇÃO

O jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) é um peixe de água doce nativo das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, com grande importância econômica e ambiental para o Brasil e outros países sul-americanos. Pertence à ordem Siluriforme e a família Pimelodidae, família que agrupa várias espécies nativas de interesse para a criação comercial em fazendas, conhecidas como grandes bagres brasileiros (CRUZ-CASALLAS et al., 2011; VIVEIROS, 2011; SAINT-PAUL, 2017).

Quanto à sua reprodução, é uma espécie de hábitos migratórios, dependente do clima e estações do ano, sendo necessária a indução hormonal para a produção de alevinos em cativeiro. Uma das características dos machos da espécie é a pequena quantidade de sêmen produzida, com grande dificuldade na sua coleta (MIRA LOPEZ et al., 2010; VIVEIROS, 2011; ARAÚJO et al., 2014).

Na aquicultura, o jundiá amazônico apresenta boas características zootécnicas, como qualidade da carne, rusticidade e boa aceitação de rações secas, sendo utilizado em cruzamentos interespecíficos com outros bagres (*Pseudoplatystoma sp*) na produção comercial de peixes híbridos, alcançando altas produtividades sob sistemas intensivos de criação (CRUZ-CASALLAS et al., 2011; BERNARDES et al., 2016; SAINT-PAUL, 2017).

A criopreservação de sêmen de peixes é uma importante ferramenta tanto para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, com a melhoria na produção de larvas e juvenis, como para a conservação de recursos genéticos em bancos de germoplasma, com a manutenção da variabilidade genética

(CAROSFELD et al., 2003; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017). No entanto, existem grandes variações de protocolos entre as várias espécies de peixes e falta ainda a padronização de cada etapa do processo para que a técnica seja acessível em escala comercial nas fazendas de criação de peixes (GARCIA et al., 2016; ASTURIANO et al., 2017).

No jundiá amazônico, este é o primeiro relato da criopreservação de sêmen, e contribuirá com a manutenção da variabilidade genética de linhagens puras e a conservação de estoques naturais, além de auxiliar na sincronização dos reprodutores nos cruzamentos interespecíficos. Sendo que existem poucos estudos sobre as características morfológicas dos seus espermatozoides e a conservação de seu sêmen (MIRA LOPEZ et al., 2010; ARAÚJO et al. 2014; GALO et al., 2014; NAVARRO e PIVATO, 2016).

Para o congelamento dos espermatozoides é necessário a utilização de meios de diluição contendo agentes crioprotetores permeáveis e não-permeáveis à membrana celular, sendo que o crioprotetor não-permeável mais utilizado em peixes é a glicose a 5% (CAROSFELD et al., 2003; GARCIA et al., 2016; ELLIOT et al., 2017). Como crioprotetores permeáveis são mais utilizados o metanol e o dimetilsulfóxido (DMSO), geralmente a 10% e em menor escala o etilenoglicol (VIVEIROS, 2011; MURGAS et al., 2014; ASTURIANO et al., 2017).

Na avaliação da qualidade do sêmen, a motilidade é um dos parâmetros mais utilizados, sendo que a utilização de soluções ativadoras pode contribuir para o aumento da intensidade e duração dos movimentos, em função da redução dos impactos osmóticos (MURGAS et al., 2014; VIVEIROS et al., 2016). As soluções de cloreto de sódio (NaCl a 0,29%) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃ a 1%) tem apresentado os melhores resultados, variando a sua eficiência de acordo com as espécies de peixes (CAROSFELD et al., 2003; VIVEIROS et al., 2011; GARCIA et al., 2016).

Objetivou-se pela primeira vez a avaliação dos efeitos dos agentes crioprotetores e soluções ativadoras na morfologia e motilidade espermática, e a análise da ultraestrutura e morfometria do espermatozoide do jundiá amazônico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização

A coleta de sêmen foi realizada durante o terço final da estação reprodutiva, em fevereiro de 2016, nas instalações da piscicultura Cia do Peixe, localizada no município de Cidade Ocidental, estado de Goiás, região central do Brasil, coordenadas geográficas 16°08'52''S, 47°49'01''W.

4.2 Seleção dos animais e coleta de sêmen

Durante a estação reprodutiva, onze machos de jundiá amazônico com idade entre 36 e 48 meses que apresentavam sinais de maturação sexual, como a coloração escura na região ventral e a papila urogenital hiperêmica, foram marcados individualmente com microchip RFID (Veritag, MicroChipBrasil, Brasil) inserido na musculatura da região dorsal e mantidos em viveiros escavados de terra, com renovação diária de água e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial extrusada com 32% de proteína bruta.

No dia anterior a coleta, os peixes previamente selecionados quanto à maturação sexual, foram medidos para peso corporal e comprimento total, sendo transferidos para tanques de alvenaria de 2.000 litros com renovação constante de água. Os animais foram submetidos ao tratamento de indução hormonal na dosagem única de 3,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (Danúbio Aquacultura, Brasil) por kg de peso vivo, aplicados via intramuscular na região dorsal, e mantidos nos mesmos tanques com temperatura média da água de $26,5 \pm 1,0$ °C.

Após 12 horas da indução, os peixes foram contidos com toalha de algodão e a papila urogenital foi cuidadosamente limpa e seca com papel absorvente. Em seguida, os animais foram massageados na região ventral no sentido anteroposterior para a liberação do sêmen. A coleta do sêmen foi feita em tubos plásticos graduados, com o cuidado de evitar a contaminação com água, urina e fezes.

O procedimento da coleta de sêmen foi realizado de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de Brasília, protocolo nº 147533/2015.

4.3 Avaliação da qualidade do sêmen fresco

Imediatamente após a coleta, 5 μ L de sêmen de cada amostra foi colocada em lâmina e lamínula, sendo avaliada quanto à ativação prévia, em microscópio óptico (Zeiss, Berlim, Alemanha) no aumento de 400 vezes. As amostras com a presença de espermatozoides móveis foram descartadas.

Para cada uma das amostras selecionadas, foram avaliados os parâmetros de motilidade, vigor espermático, colocando uma alíquota de 1 μ L de sêmen em lâmina de vidro seguida da adição de 25 μ L de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1% (sêmen:ativador, 1:25), coberta com lamínula, sendo imediatamente avaliada em microscópio óptico (Zeiss, Berlim, Alemanha) no aumento de 400 vezes. A taxa de motilidade foi calculada avaliando o percentual de espermatozoides com movimentos progressivos e para o vigor espermático foi utilizada uma escala visual de 0 (sem movimento) a 5 (movimento rápido) e na mesma lâmina foi medida em segundos a duração da motilidade, adaptado da metodologia proposta por Viveiros et al. (2012).

Para análise das anormalidades morfológicas e da concentração espermática, 10 μ L de cada amostra de sêmen fresco foram diluídos em 990 μ L de solução fixadora de formol salina a 4% (v:v). Para o cálculo das anormalidades morfológicas, 5 μ L de sêmen fixado foram colocados em lâmina de vidro seguido da adição de 25 μ L do corante Rosa Bengala a 4% (p:v), coberta por lamínula em preparação úmida e observado em microscópio óptico (Zeiss, Berlim, Alemanha) no aumento de 1.000 vezes, avaliando 200 espermatozoides por lâmina, adaptado da metodologia proposta por Miliorini et al. (2011). O cálculo da concentração

espermática foi feito por meio da contagem das células na câmara de Neubauer (NewOptics, Germany) em microscópio ótico (Zeiss, Berlim, Alemanha) no aumento de 400 vezes, expresso em número de células por mL.

As análises de motilidade espermática foram realizadas nas instalações da piscicultura Cia do Peixe. As análises de concentração e morfologia espermática foram conduzidas no Laboratório de Aquicultura, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília.

4.4 Avaliação da ultraestrutura e morfometria espermática

Foram retirados de cada amostra de sêmen fresco 100 µL que foram adicionados a tubos plásticos, contendo 2,0 mL de solução de Karnovsky com glutaraldeído a 2,5%, onde permaneceram por 24 horas em temperatura de 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3 min; 1000 rpm) para a retirada da solução fixadora e o pellet ressuspendido em solução tampão 0,1M de cacodilato de sódio, repetindo o processo de lavagem por três vezes.

As amostras foram divididas em duas partes, sendo que metade das amostras foi depositada em lamínulas recoberta com poli-L-lisina à 1% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 30 min. Em seguida o material foi lavado em água destilada, e desidratado em série crescente de acetona (50, 75, 90 e 100%). A secagem foi feita com dióxido de carbono líquido em aparelho de ponto crítico (Balzers CPD-20, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram cobertas com película de ouro com espessura de 10 nm em metalizador (Balzers MED-010, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-7000F, Japão) e as imagens digitais obtidas foram analisadas utilizando o aplicativo ImageJ, onde foram avaliados os parâmetros de comprimento (HL) e largura (HW) da cabeça, o comprimento da peça intermediária (ML), o comprimento da cauda (FL) e o comprimento total (TL), sendo mensurados 25 espermatozoides de cada animal (n=150).

A outra metade das amostras foi pós-fixada em tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio 1,6% por 30 minutos, lavadas em água destilada e contrastadas em acetato de uranila a 3% por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em água destilada, desidratadas em série crescente de

acetona (50, 75, 90 e 100%) e incluídas em resina epóxi Spurr, sendo cortadas em seções ultrafinas de 50 a 70 nm em ultramicrotomo (Leica EM-UC7, Viena, Áustria). Os cortes ultrafinos foram analisados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011, Japão).

Na análise da estrutura dos espermatozoides, foram observadas a presença e a disposição das estruturas celulares. As análises de ultraestrutura e morfometria foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília.

4.5 Congelamento do sêmen e diluidores

Para o processo de congelamento, foram utilizadas as amostras de seis machos (n=6) que apresentaram taxa de motilidade espermática acima de 70%, e ausência de contaminação ou ativação prévia.

Foi utilizada como diluente padrão uma solução isotônica de glicose a 5% (crioprotetor não-permeável), sendo essa solução acrescentada com três diferentes agentes crioprotetores permeáveis: dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma, St. Louis, MI), etilenoglicol (EG - Dinâmica, Brasil) e metanol (MeOH - Dinâmica, Brasil), formando três soluções diluidoras distintas:

- . Solução 1 (DMSO 10%) - 10 mL de DMSO e 80 mL de solução de glicose a 5%.
- . Solução 2 (EG 10%) - 10 mL de etilenoglicol e 80 mL de solução de glicose a 5%.
- . Solução 3 (MeOH 10%) - 10 mL de metanol e 80 mL de solução de glicose a 5%.

As amostras de sêmen foram diluídas na proporção final de 10% de sêmen, 90% de solução diluidora (1:9), sendo estabelecidos três tratamentos (DMSO 10%, EG 10% e MeOH 10%). As proporções utilizadas mantiveram a concentração final dos crioprotetores em 10% (v:v), mesmo após a diluição com o sêmen.

Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL (Minitube, Alemanha), identificadas por animal e por tratamento. As extremidades abertas das palhetas foram seladas com álcool polivinílico em pó

(Minitube, Alemanha). Após o envase, as palhetas foram acondicionadas em raques de alumínio e mantidas por 10 minutos em equilíbrio na temperatura entre 4 e 10 °C.

Na sequência as amostras foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (CryoFarm, YDH-3/50, Savigliano, Itália) a taxa de 35°C min⁻¹, com estabilização gradual até -180°C, em aproximadamente 5 minutos. Depois de 24 horas, as amostras foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (MVE, Millennium 2000 XC-20, Geórgia, EUA) em temperatura de -196°C, onde foram mantidas até a análise das amostras (adaptado de Carosfeld et al. 2003). No total, foram congeladas 72 palhetas, sendo seis machos, três tratamentos e quatro palhetas réplicas por tratamento.

A etapa de congelamento das amostras foi realizada nas instalações da piscicultura Cia do Peixe. Após o congelamento o botijão de nitrogênio com as amostras foi transferido para o Laboratório de Aquicultura, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília.

4.6 Descongelamento do sêmen e soluções ativadoras

Após 180 dias, as palhetas contendo o sêmen criopreservado foram descongeladas em banho-maria com água aquecida na temperatura de 40°C, agitando levemente por 12 segundos. Para a avaliação das características de taxa de motilidade, vigor espermático e duração da motilidade do sêmen pós-descongelamento foram utilizados dois agentes ativadores, a solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃ a 1%), e a solução de cloreto de sódio (NaCl a 0,29%). Para cada uma das amostras foram utilizados os dois ativadores na proporção de 1:25 (sêmen:ativador), repetindo os procedimentos feitos para o sêmen fresco.

Para análise das anormalidades na morfologia espermática de cada tratamento, 10µL de cada amostra de sêmen descongelado foram diluídos em 90µL de solução fixadora de formol salina a 4% (v:v), repetindo os mesmos procedimentos feitos para o sêmen fresco.

As análises de motilidade e morfologia espermática foram conduzidas no Laboratório de Aquicultura, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília.

4.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados. Cada animal representando um bloco, sendo estes considerados como unidade experimental, onde foram aplicados os tratamentos. Os dados foram expressos em valores médios e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Todos os valores foram testados quanto à distribuição normal dos resíduos, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os valores em porcentagem foram transformados pela raiz quadrada do arcosseno. Os valores de motilidade, duração de motilidade, morfologia e diferenças entre tratamentos (crioprotetores e ativadores) foram testados pela análise de variância (GLM) seguida pelo teste de Tukey. Os valores de vigor espermático foram testados com análise não paramétrica por meio do teste de Friedman. Para todos os testes estatísticos foi utilizado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

As características corporais e espermáticas dos machos de *Leirius marmoratus* utilizados no experimento estão descritas na Tabela 1. O tratamento de indução hormonal foi aplicado em onze animais, sendo que foi possível a coleta de amostras, sem contaminação e ativação prévia, de seis animais. As amostras de sêmen fresco apresentaram coloração branca, baixa viscosidade e pequeno volume.

Tabela 1. Peso corporal, comprimento e características do sêmen fresco em jundiá amazônico (*Leirius marmoratus*) mantido em cativeiro

Características (n=6)	Média ± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Peso corporal (g)	1.560 ± 158	1.420	1.785
Comprimento total (cm)	56,8 ± 2,1	53	59
Volume de sêmen (mL)	0,66 ± 0,28	0,3	1,0
Concentração (células x 10 ⁹ mL ⁻¹)	2,508 ± 2,156	1,165	6,68
Espermatozoides normais (%)	84,08 ± 4,27	78	89
Taxa de motilidade (%)	84,2 ± 4,9	75	90
Duração de motilidade (s)	139,8 ± 18,7	118	165

Machos com idade entre 36 e 48 meses, induzidos hormonalmente com 3,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa por kg de peso vivo.

5.1 Ultraestrutura e morfometria espermática

Os espermatozoides de *Leirius marmoratus* apresentaram formato esférico e a ausência de acrossoma (Figuras 1-A e 2-A). A cabeça tinha pequeno citoplasma e núcleo de formato esférico. No interior do núcleo a cromatina estava homogênea e densa (Figura 2-A). A fossa nuclear estava ausente e o complexo centriolar e o segmento inicial do flagelo estavam localizados na base do núcleo (Figura 2-C). A peça intermediária era curta, sem canal citoplasmático verdadeiro, apresentando formato cônico e ligeiramente assimétrica, com a presença de

vesículas concentradas em uma das laterais (Figuras 1-B e 2-A). As mitocôndrias eram irregulares e alongadas, em número não superior a quatro, e estavam distribuídas em forma de anel ao longo da peça intermediária (Figuras 2-A e 2-C). Foi observada cauda única, com arranjo típico de axonemas, formado por nove pares periféricos e um par central (9+2) de microtúbulos. A presença de projeções de membrana laterais não foi identificada na cauda (Figuras 1-A e 2-B). Os parâmetros morfométrico mensurados de comprimento (HL) e largura (HW) da cabeça, o comprimento da peça intermediária (ML), o comprimento da cauda (FL) e o comprimento total (TL), estão demonstrados na Tabela 2.

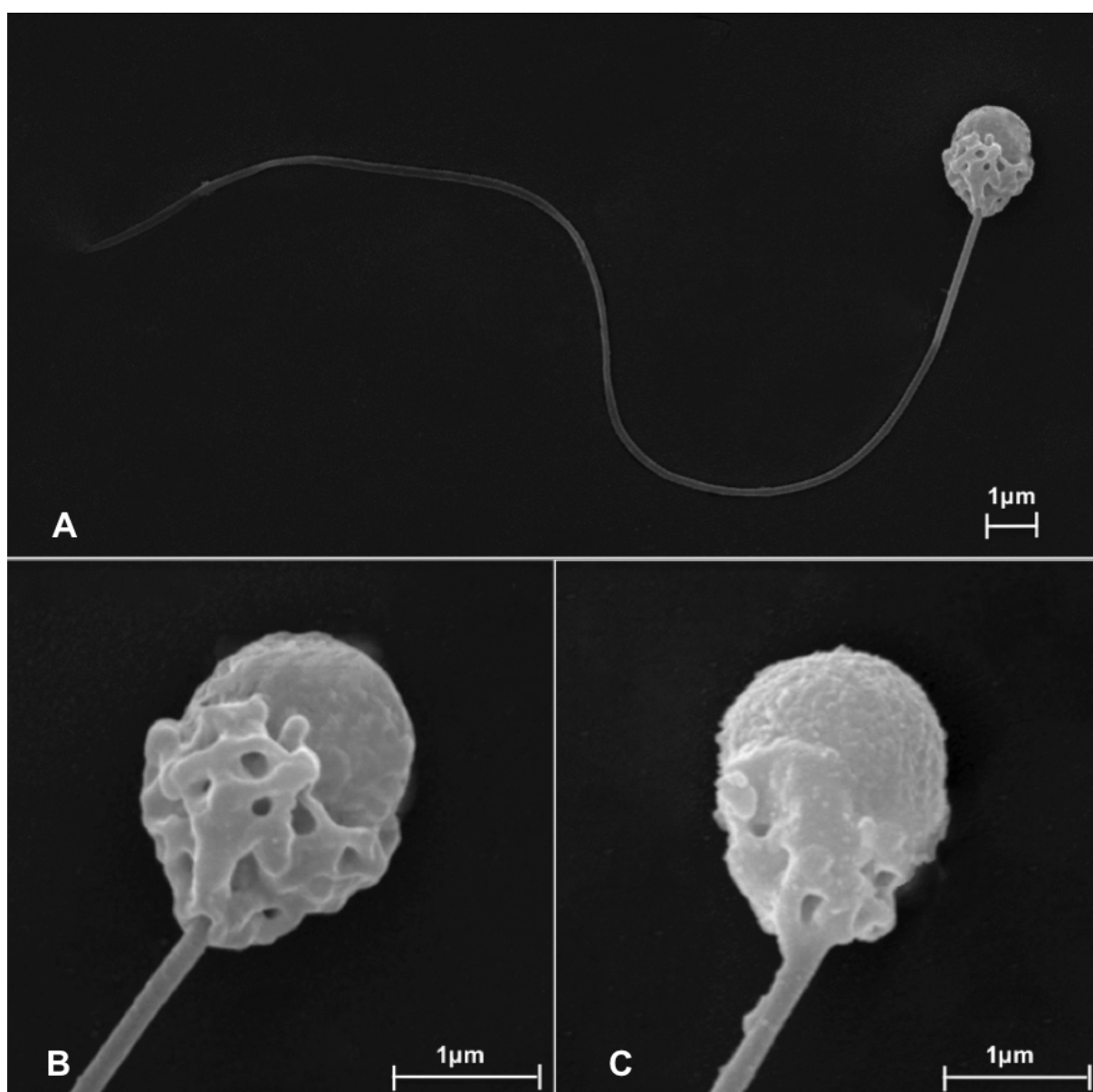


Figura 1. A- Vista geral do espermatozoide de jundiá amazônico (*Leirius marmoratus*). B- Vista frontal da peça intermediária. C- Vista lateral da peça intermediária.

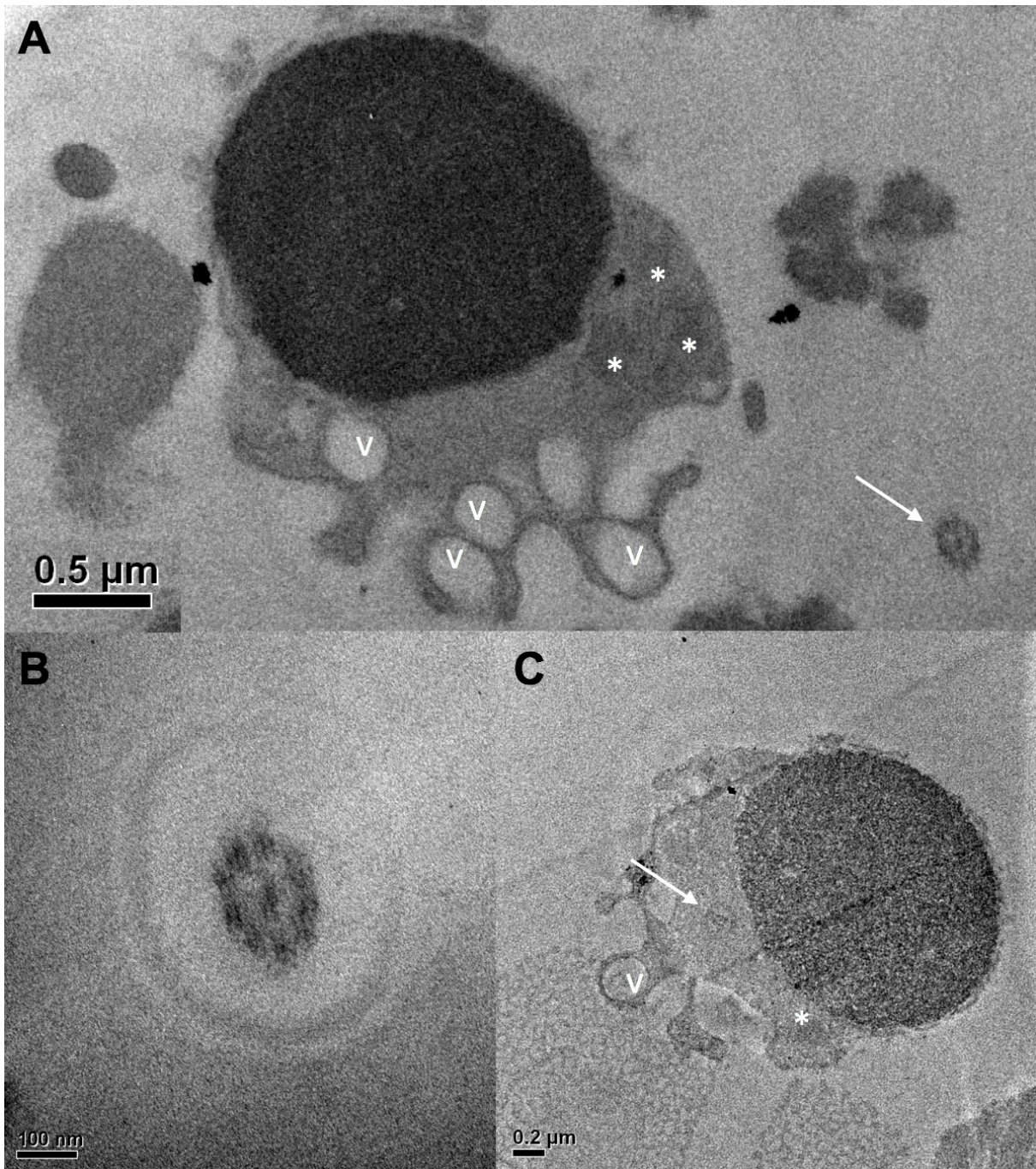


Figura 2. A- Vista interna do espermatozoide de jundiá amazônico (*Leirius marmoratus*) e detalhes da peça intermediária. B- Estrutura do flagelo com o arranjo dos axonemas. C- Base do núcleo com o início do flagelo. v- vesículas, *- mitocôndrias, setas indicando os flagelos.

Tabela 2. Análise morfométrica de espermatozoides de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em cativeiro

Parâmetros em μm (n=150)	Média \pm desvio padrão
Comprimento da cabeça (HL)	1,51 \pm 0,18
Largura da cabeça (HW)	1,58 \pm 0,14
Comprimento da peça intermediária (ML)	0,93 \pm 0,17
Comprimento do flagelo (FL)	21,48 \pm 2,45
Comprimento total (TL)	25,46 \pm 2,54

Machos com idade entre 36 e 48 meses, induzidos hormonalmente com 3,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa por kg de peso vivo.

5.2 Qualidade espermática pós-descongelamento

Os valores das médias observadas para os parâmetros de motilidade, avaliados no sêmen descongelado, quando foram utilizados as três soluções diluidoras e duas soluções ativadoras, estão demonstrados na Tabela 3. Para os parâmetros de duração, vigor e taxa de motilidade espermática no sêmen descongelado, os valores observados nos tratamentos que usaram os crioprotetores metanol a 10% e dimetilsulfóxido a 10%, foram significativamente mais altos ($p < 0,05$) quando comparados com o crioprotetor etilenoglicol a 10%. A duração da motilidade espermática observada foi significativamente maior ($p < 0,05$) com a ativação com NaHCO_3 1% em comparação com a ativação com NaCl 0,29% para todos os crioprotetores.

Na avaliação morfológica não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os meios de congelamento para as frequências observadas de defeitos totais, de cabeça, de peça intermediária e de cauda (Tabela 4). No entanto, as alterações morfológicas que apresentaram as maiores frequências no sêmen descongelado foram cabeça isolada, cabeça degenerada, cauda dobrada e cauda enrolada (Figura 3).

Tabela 3. Taxa, vigor e duração de motilidade em sêmen criopreservado de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) utilizando três soluções diluidoras e duas soluções ativadoras

Meios de congelamento	Soluções ativadoras	
	NaCl a 0,29%	NaHCO ₃ a 1%
Taxa de motilidade (%)		
Glicose 5% + MeOH 10%	8,30 ± 5,84*	8,94 ± 6,69*
Glicose 5% + DMSO 10%	6,86 ± 3,55*	7,32 ± 4,21*
Glicose 5% + EG 10%	0,65 ± 1,53	0,85 ± 1,81
Vigor da motilidade (0-5)		
Glicose 5% + MeOH 10%	1,60 ± 0,55*	1,72 ± 0,71*
Glicose 5% + DMSO 10%	1,45 ± 0,63*	1,59 ± 0,65*
Glicose 5% + EG 10%	0,20 ± 0,38	0,25 ± 0,50
Duração da motilidade (segundos)		
Glicose 5% + MeOH 10%	87,15 ± 25,02*	99,83 ± 27,87*§
Glicose 5% + DMSO 10%	86,09 ± 30,39*	96,41 ± 33,90*§
Glicose 5% + EG 10%	14,55 ± 25,98	21,60 ± 38,46§

MeOH-metanol, DMSO-dimetilsulfóxido, EG-etilenoglicol; NaCl-cloreto de sódio, NaHCO₃-bicarbonato de sódio; *diferença significativa maior na mesma coluna ($p < 0,05$); § diferença significativa maior na mesma linha ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Morfologia espermática em sêmen criopreservado de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) utilizando três meios de congelamento

	MeOH 10%	DMSO 10%	EG 10%
	%	%	%
Normais	35,50 ± 12,46	30,75 ± 5,30	29,42 ± 17,89
Defeitos Totais	64,50 ± 12,46	69,25 ± 5,30	70,58 ± 17,89
Defeitos Cabeça	36,83 ± 9,00	47,33 ± 6,95	43,33 ± 17,09
Macrocefalia	2,67 ± 2,50	1,42 ± 0,74	4,00 ± 3,79
Microcefalia	3,67 ± 2,29	7,17 ± 3,97	2,42 ± 1,50
Cabeça Degenerada	9,50 ± 7,40	18,25 ± 7,49	10,17 ± 4,89
Cabeça Isolada	20,58 ± 6,29	20,50 ± 11,47	26,42 ± 17,46
Defeitos Peça Intermediária	5,92 ± 3,72	1,75 ± 2,60	4,17 ± 3,03
Peça Intermediária Degenerada	5,92 ± 3,72	1,75 ± 2,60	4,17 ± 3,03
Defeitos Cauda	21,50 ± 5,67	20,17 ± 7,35	23,42 ± 8,42
Cauda Fraturada	3,58 ± 1,20	3,00 ± 1,87	5,50 ± 3,39
Cauda Enrolada	3,83 ± 2,09	2,50 ± 1,18	2,83 ± 1,51
Cauda Degenerada	6,17 ± 1,47	9,25 ± 1,72	6,25 ± 3,09
Cauda Dobrada	7,83 ± 2,75	5,42 ± 4,03	8,83 ± 6,02

MeOH-metanol, DMSO-dimetilsulfóxido, EG-etilenoglicol todos a 10% em solução de glicose a 5%; Os resultados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), para os parâmetros normais e os diferentes defeitos entre os crioprotetores utilizados, pelo teste de Tukey.

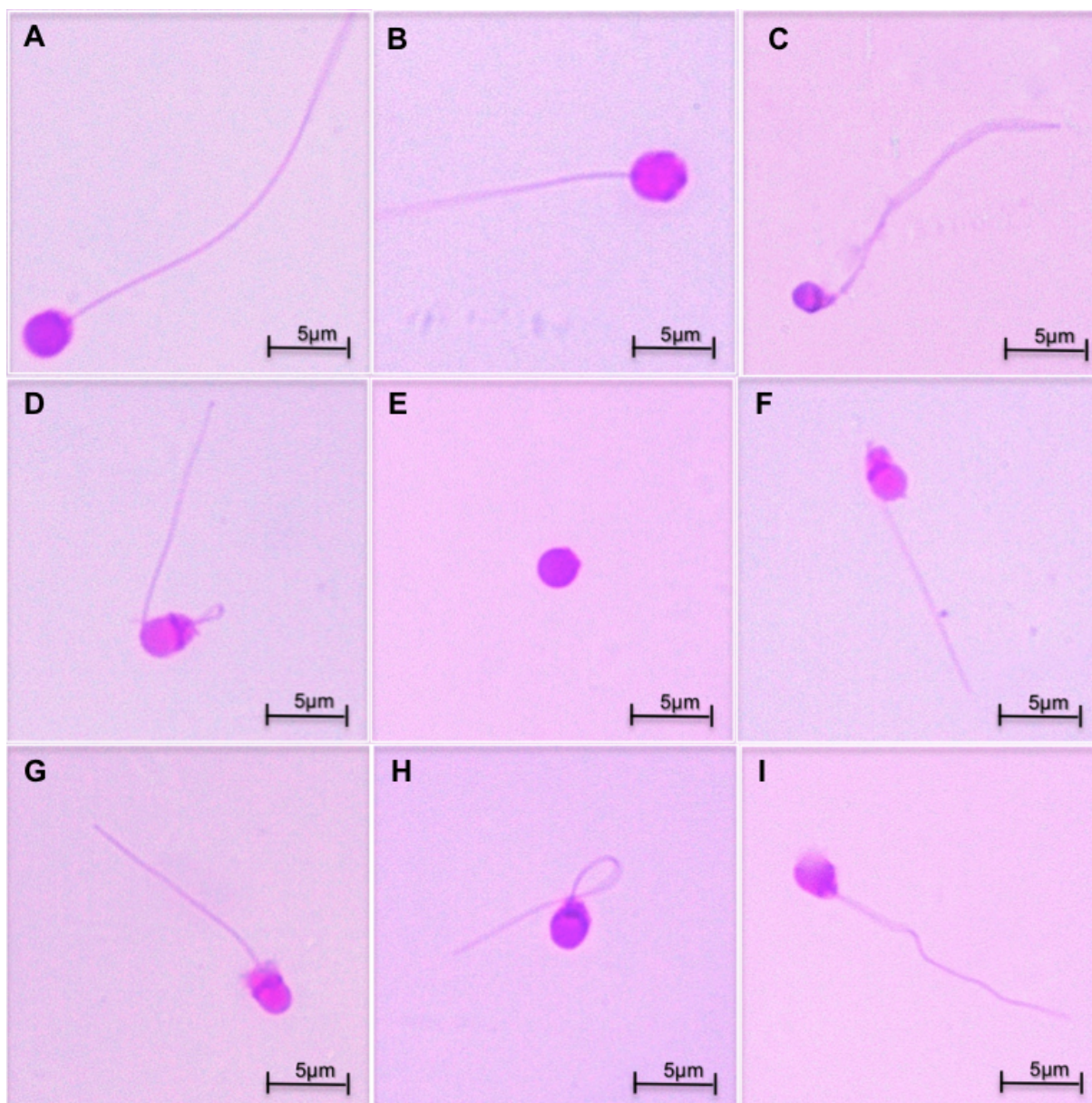


Figura 3. Principais anormalidades morfológicas observadas no sêmen do jundiá amazônico pós-descongelamento: A- espermatozoide normal; B- macrocefalia; C- microcefalia e cauda degenerada; D- cauda fortemente enrolada; E- cabeça isolada; F- cauda fraturada; G- peça intermediária degenerada; H- cauda dobrada; I- cabeça e cauda degeneradas.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os parâmetros encontrados para o sêmen fresco do jundiá amazônico após a indução hormonal (Tabela 1), estão de acordo com os dados descritos previamente para a espécie. Com exceção para os volumes coletados, 0,3 a 1,0 mL, que foram menores do que os valores descritos por Mira-Lopez et al. (2010) e por Araújo et al. (2014), respectivamente 1,59 a 2,84 mL e 1,45 mL.

Esta espécie apresentou grande dificuldade na coleta durante a espermiacção, com pequenos volumes obtidos e contaminação frequente com urina. Esta característica é comum a outros siluriformes, onde os machos raramente liberam sêmen sem o uso de indução hormonal, sendo que em algumas espécies é necessário a extração dos testículos (VIVEIROS, 2011; GALO et al., 2014; DAMASCENO et al., 2017).

A concentração espermática ficou bem próxima dos valores observados por Araújo et al. (2014), $3,13 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, e Navarro e Pivato (2016), $1,79 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, e dentro da faixa mais ampla, $1,87-6,30 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ registrada por Mira-López et al. (2010). A motilidade espermática observada de 84% foi semelhante a maioria dos relatos (MIRA-LOPEZ et al. 2010; GALO et al. 2014; NAVARRO e PIVATO, 2016). Quanto a duração da motilidade, Mira-Lopez et al. (2010), Araújo et al. (2014) e Galo et al. (2014) observaram valores menores, entre 52 e 110 segundos, enquanto que Navarro e Pivato (2016) registraram valores médios de 318

segundos. A frequência de espermatozoides com anormalidades observadas foi de 15,92%, semelhante a descrita por Araújo et al. (2014) de 12,57%, enquanto que Galo et al. (2014) e Navarro e Pivato (2016) relataram frequências maiores, respectivamente 26 e 44%.

As variações encontradas para o sêmen fresco do jundiá amazônico estão relacionadas ao baixo grau de domesticação dos reprodutores utilizados. Entre os peixes neotropicais migratórios, este é um dos fatores que influencia na qualidade seminal, em conjunto com o uso de indução hormonal e o período da estação reprodutiva (VIVEIROS, 2011; ARAÚJO et al., 2014; MURGAS et al., 2014; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017).

6.1 Ultraestrutura e morfometria espermática

Os espermatozoides dos peixes siluriformes são bem semelhantes morfologicamente, com cabeça pequena de formato esférico ou ovoide, sem acrossoma, peça intermediária de formato variável, podendo apresentar vesículas, e a cauda uni ou biflagelada, sendo classificados como “aquasperm” primitivos (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008). No presente estudo os espermatozoides do jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) apresentaram características que indicam a sua classificação como tipo “aquasperm”, sendo a cabeça arredondada com comprimento de 1,51 μm e largura de 1,58 μm , sem acrossoma, e com cauda única medindo 21,48 μm . Valores maiores foram descritos por Viveiros et al. (2012) e Murgas et al. (2017) para outros peixes neotropicais, respectivamente para diâmetro da cabeça e comprimento da cauda, 2,06 e 26,46 μm em curimatá (*Prochilodus lineatus*), 1,88 e 27,03 μm em dourado (*Salminus brasiliensis*), 2,19 e 26,46 μm em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*) e, 2,00 e 30,90 μm em pirapitinga (*Brycon nattereri*).

A morfologia dos espermatozoides está relacionada a estratégia reprodutiva da espécie, sendo que nos siluriformes, Melo et al. (2011) demonstraram que os formatos arredondado ou esférico estão presentes nos peixes de reprodução externa em ambientes pelágicos ou demersais, como no pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), mandi (*Pimelodus maculatus*), pirá-tamanduá (*Conorhynchus conirostris*), pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) e cascudo preto (*Rhinelepis aspera*),

enquanto que o formato alongado está presente nos peixes de reprodução interna como no bagre anujá (*Trachelyopterus galeatus*).

Na análise da estrutura interna, o espermatozoide do jundiá amazônico apresentou um núcleo esférico com cromatina homogênea. Foram observadas também a ausência da fossa nuclear e de canais citoplasmáticos, que são características singulares dos siluriformes pimelídeos, decorrentes da espermiogênese tipo III, observada nessa família de peixes. Nesse tipo de espermiogênese, o núcleo não sofre rotação e o eixo da cauda se mantém central em relação ao núcleo, não sendo formados os canais citoplasmáticos e a fossa nuclear (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008; MELO et al., 2017).

A peça intermediária apresentou formato cônico com comprimento de 0,93 μm , envolvendo a base da cabeça, com várias vesículas e a presença de 2 a 4 mitocôndrias dispostas em forma de anel, sendo o formato e a descrição compatível com os achados em peixes siluriformes (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008; MELO et al., 2017). Em peixes caraciformes, geralmente a peça intermediária é maior (3,41 a 1,61 μm), sem a presença de vesículas, com número variável de mitocôndrias, sendo mais longa e de formato cilíndrico (VIVEIROS et al., 2012; MURGAS et al., 2017).

Foi observada uma cauda única, sem a presença de projeções laterais de membrana, com o arranjo interno dos axonemas típico de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central (9+2). Esse é um formato frequente observado nos peixes de água doce, sendo que algumas espécies apresentam alterações na membrana com a presença de anéis concêntricos, projeções laterais de membrana ou a presença de uma aleta na porção final do flagelo (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008; VIVEIROS et al., 2012; MELO et al., 2017). No entanto, essas modificações de membrana não foram observadas nos espermatozoides de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*).

6.2 Soluções diluidoras e qualidade espermática pós-descongelamento

No presente estudo foram utilizadas três soluções diluidoras compostas por solução de glicose a 5% (p:v) associada aos crioprotetores permeáveis, dimetilsulfóxido (DMSO) ou etilenoglicol ou metanol, todos a 10% (concentração na

diluição final). As taxas de motilidade espermática mais altas ($p < 0,05$) foram observados com o metanol ($8,94 \pm 6,69\%$) e o DMSO ($7,32 \pm 4,21\%$), mostrando que o etilenoglicol foi o menos eficiente na proteção interna dos espermatozoides. No entanto, houve uma redução da taxa de motilidade quando comparada com o que foi observado no sêmen fresco ($84,2 \pm 4,9\%$), demonstrando também que o diluente básico de glicose a 5%, agindo como crioprotetor não-permeável, não conseguiu atuar de maneira adequada na desidratação celular, no aumento da viscosidade do meio e na estabilização das membranas celulares antes do processo de congelamento (GARCIA et al. 2016; ELLIOTT et al. 2017).

Em estudo similar no tambaqui (*Colossoma macropomum*), com o uso de diluentes simples de glicose com DMSO, foram observadas taxas reduzidas de motilidade pós-descongelamento de 18%, tanto para glicose como para o BTS (GARCIA et al., 2015). Em contraste, para peixes do gênero *Brycon* não foram encontradas diferenças entre diluentes simples de glicose e solução salina de NaCl a 0,9%, combinados com DMSO ou metilglicol, com taxas de motilidade pós-descongelamento de 76 a 79% para pirapitinga (*B. nattereri*), e de 64% para piabanha (*B. insignis*), demonstrando que algumas espécies possuem uma maior resistência aos processos de congelamento e descongelamento mesmo na ausência dos efeitos da glicose (VIVEIROS et al., 2011; VIVEIROS et al., 2012). A avaliação de diluentes com composição e preparação mais simples pode facilitar a padronização e aplicação da criopreservação em larga escala (ASTURIANO et al., 2017).

Por sua vez, os crioprotetores permeáveis possuem atuação nas propriedades coligativas tanto no meio intracelular como extracelular e também podem atuar na estabilização das membranas celulares (GARCIA et al., 2016; ELLIOTT et al., 2017). O metanol possui menor peso molecular e permeabilidade celular mais rápida quando comparado com DMSO e etilenoglicol (ELLIOTT et al., 2017). Em bagre africano (*Clarias gariepinus*), foi demonstrado que em concentrações acima de 15%, o metanol é menos tóxico do que o DMSO (VIVEIROS, 2011).

No entanto, o DMSO é o agente crioprotetor mais utilizado na criopreservação de sêmen de peixes de água doce, sendo que a escolha da combinação entre os agentes crioprotetores permeáveis e não-permeáveis é bem

variável (MURGAS et al., 2014; GARCIA et al., 2016). Enquanto que em carpas comuns (*Cyprinus carpio*) o etilenoglicol apresenta melhores resultados na proteção dos espermatozoides do que o DMSO (LI et al., 2010). De maneira objetiva, é muito difícil separar os efeitos tóxicos dos crioprotetores, dos seus efeitos osmóticos sobre as células (ELLIOTT et al., 2017).

A osmolaridade e a presença de íons no meio aquático são os principais fatores envolvidos na ativação e duração da motilidade, e em consequência, influenciam no período de fertilidade dos espermatozoides de peixes (COSSON, 2010; VIVEIROS et al., 2016). As diferenças encontradas entre as espécies podem estar relacionadas à composição da membrana plasmática, e à resposta das células ao estresse osmótico (BROWNE et al., 2015).

No estudo atual, as soluções ativadoras não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) sobre a taxa e o vigor da motilidade do sêmen criopreservado. Enquanto a duração da motilidade foi mais longa ($p < 0,05$) quando as amostras foram ativadas com NaHCO_3 a 1% (21-99 s) comparada com a ativação com NaCl a 0,29% (14-87 s). As diferenças observadas podem ser relacionadas às diferenças na osmolaridade das soluções, 80 mOsm kg^{-1} em NaCl a 0,29%, e 220 mOsm kg^{-1} em NaHCO_3 a 1%.

Resultados semelhantes foram observados em sêmen de criopreservado de pirapitinga (*Brycon nattereri*), foram testadas soluções de NaCl a 0,29% (80 mOsm) e NaHCO_3 a 1% (220 mOsm), com a taxa de motilidade igual para as duas soluções, e a duração maior com NaHCO_3 a 1% (VIVEIROS et al., 2012). Enquanto que em sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), foram observadas taxas de duração e motilidade espermática maiores para água destilada (30 mOsm) e NaCl a 0,3% (99 mOsm) em comparação com as soluções de osmolaridade mais alta (FELIZARDO et al., 2011).

Os crioprotetores também apresentaram diferenças ($p < 0,05$) sobre a duração da motilidade, sendo mais longa com o metanol (87-99 s) e o DMSO (86-96 s) em comparação com o etilenoglicol que apresentou a menor duração (14-21 s). Apesar da diminuição observada em relação ao sêmen fresco (139,8 s), a duração para o metanol e o DMSO deve ser suficiente para que os espermatozoides alcancem a micrópila dos oócitos e ocorra a fecundação (VIVEIROS et al., 2012; GARCIA et al., 2016).

No presente estudo, a análise morfológica não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos para defeitos totais, cabeça, peça intermediária e cauda, sendo que foram mais frequentes após a criopreservação os defeitos observados na região da cabeça. Em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) também não foram encontradas diferenças na morfologia espermática pós-descongelamento, quando foram utilizados o metanol e o DMSO (FELIZARDO et al., 2016).

No entanto, as anormalidades totais observadas aumentaram de 15,8% no sêmen fresco para 64,5 e 69,25% no criopreservado, respectivamente para metanol e DMSO. Assim ficou demonstrado que a combinação dos crioprotetores utilizados, conseguiu proteger apenas parcialmente as células dos danos físicos e osmóticos causados pelo processo de congelamento e descongelamento.

Em outro estudo, quando o sêmen fresco de jundiá amazônico foi submetido a resfriamento a 13°C por 7 horas, o total dos defeitos passou de 27 para 37%, sendo observado que a medida que os defeitos aumentaram ocorreu a diminuição da motilidade progressiva de 87 para 29% (GALO et al., 2014). Em curimba (*Prochilodus lineatus*), com diluidores de glicose com DMSO ou metanol a quantidade de anormalidades aumentou de 3 para 29,5%, com maior quantidade de defeitos de cauda para o metanol, no entanto sem efeitos sobre a taxa de fertilização em comparação com o sêmen fresco (MILIORINI et al., 2011).

Por outro lado, para pirapitinga (*Brycon nattereri*) utilizando soluções diluidoras de glicose ou NaCl com metilglicol, foram observados valores pequenos de defeitos totais, entre 9,3 e 11,6% no sêmen criopreservado (VIVEIROS et al., 2012). Assim, as variações da morfologia e motilidade espermática observadas nos trabalhos estão relacionadas as formas de ação dos crioprotetores bem como às características de cada espécie, como perfil lipídico da membrana celular (GARCIA et al., 2016; ELLIOTT et al., 2017).

Apesar disso, a amplitude existente na resposta ao congelamento do sêmen em peixes nativos reforça a necessidade de protocolos específicos para cada espécie, como no caso específico do jundiá amazônico.

7 CONCLUSÃO

O sêmen do jundiá amazônico seguiu o mesmo padrão morfométrico e estrutural observado em peixes da família Pimelodidae, com destaque para a peça intermediária cônica levemente assimétrica e a presença de vesículas.

O processo de criopreservação do sêmen jundiá amazônico pode ser feito com uso dos agentes crioprotetores metanol ou DMSO, associados à solução de glicose a 5%, sendo indicado a ativação com o uso de solução de NaHCO_3 (1%). No entanto, os resultados não foram satisfatórios para estabelecer um protocolo para a espécie e novos estudos devem concentrar-se na escolha de meios de congelamento que possam melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.

ARAÚJO, J. E. X. S.; STREIT JR, D. P.; RIBEIRO, J. S. A.; MARTINS, E. F. F.; SOUZA, F. N.; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A. Ovopel and Carp Pituitary Extract as Spawning Inducers in Males of the Amazon Catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 882-886, 2014.

ASTURIANO, J. F., CABRITA, E., HORVATH, A., 2016. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v.245, p.69-76, 2017.

BERNARDES, C. L.; NAVARRO, R. D.; GUERRA-SANTOS, B.; FORTES-SILVA, R. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth, body composition, and nutrient utilization of hybrid catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 29, p. 58-65, 2016.

BROWNE, R. K.; KAUROVA, S. A.; UTESHEV, V. K.; SHISHOVA, N. V.; MCGINNITY, D.; FIGIEL, C. R.; MANSOUR, N.; AGNEW, D.; WU, M.; GAKHOVA, E. N.; DZYUBA, B.; COSSON, J. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 1-13, 2015.

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

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v.76, p.240-279, 2010.

CRUZ-CASALLAS, P. E; MEDINA-ROBLES, V. M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Fish farming of native species in Colombia: current situation and perspectives. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 823-831, 2011.

DAMASCENO, D. Z.; KRAUSE, R. A.; ADAMES, M. S., NEUMANN, G.; GIBATHE, A.; BOMBARDELLI, R. A.; ROMAGOSA, E. Induced spermiation of *Pimelodus britskii* (Teleostei: Pimelodidae) during the reproductive period. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 862-874, 2017.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74-91, 2017.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; NAVARRO, R. D.; GONÇALVES, A. C. S.; PAULINO, M.S. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, v. 60, p. 1255-1262, 2011.

FELIZARDO, V. O.; MELO, C. C. V.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, C. S.; NAVARRO, R. D.; FREITAS, R. T. F. Optimization of artificial propagation in piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*) using criopreserved sêmen. **Cryoletters**, v. 37, n. 5, p. 330-334, 2016.

GALO, J. M.; STREIT JR, D. P.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; RESENDE, E. K.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R. P. Sperm quality of the Amazon catfish *Leiarus marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 74, n. 4, p. 933-938, 2014.

GARCIA, R. R. F.; VASCONCELOS, A. C. N.; POVH, J. A.; OBERST, E. R.; VARELA JR., A. S.; CORCINI, C. D.; STREIT JR., D. P. Functional integrity of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 599-606, 2015.

GARCIA, R. F.; STREIT JR., D. P.; CABRITA, E.; GODOY, L.C. Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges, In: **Cryopreservation in Eukaryotes**. InTech, 2016 p. 57-73.

LI, P.; LI, Z.H.; DZYUBA, B.; HULAK, M.; RODINA, M.; LINHART, O. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 852-858, 2010.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HORVÁTH, A.; LABBÉ, C.; ZHANG, T.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P.; SUQUET, M.; ADAMS, S.; VIVEIROS, A.; TIERSCH, T. R.; CABRITA, E. Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, v. 472, p. 156-177, 2017.

MELO, R. M. C.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; DOS SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Morphology**, v. 272, n. 5, p. 525-535, 2011.

MELO, R. M. C.; GOMES, D. D.; MOREIRA, D. P.; GOMES, M. R.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. **Journal of Morphology**, v. 278, p. 170-181, 2017.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G.J.M.; COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177- 187, 2011.

MIRA LOPEZ, T. M.; MEDINA, R. V. M.; CRUZ, C. P. E. Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. **Revista MVZ Córdoba**, v. 15, n. 2, p. 2070-2077, 2010.

MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; ANDRADE, E. S.; FERREIRA, M. R.; PAULA, D. A. J.; CARVALHO, A. F. S. Cryopreservation of Sperm in Brazilian Migratory Freshwater Fish, In: Dr. Hideaki Yamashiro (Ed.). **Recent Advances in Cryopreservation**. InTech, 2014. p. 59-71.

MURGAS, L. D. S.; PAULINO, M. S.; PALHARES, P. C.; MILIORINI, A. B.; ALVES, E.; FELIZARDO, V. O. Ultrastructural and morphometric analysis of gametes in Neotropical teleost fishes. **Journal of Fisheries Sciences.com**, v.11, n.1, p. 56-61, 2017.

NAVARRO, R. D.; PIVATO, I. Semen characteristics of the amazonian jundiá (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870). **Bioscience Journal**, v. 32, n. 6, p. 1552-1558, 2016.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii). **Zoologischer Anzeiger**, v. 247, p. 55-66, 2008

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5, n.1, p.1-9, 2017.

ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; FIGUEROA, E.; DÍAZ, R.; LEE-ESTEVEZ, M.; SHORT S.; FARÍAS, J.G. Mitochondria in teleost spermatozoa. **Mitochondrion**, v. 34, p. 49-55, 2017.

VIVEIROS, A. T. M. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: TIERSCH, T.R., GREEN, C.C. (Ed.). **Cryopreservation in Aquatic Species**. 2nd. ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2011. p. 387-397.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A.; CANEPPELE, 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**, v. 42, p. 858-865, 2011.

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

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M. C.; FRANÇA, T. S.; ALMEIDA, I. L. G.; ISAÚ, Z. A. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. **Animal Reproduction Science**, v.173, p.73-79, 2016.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E CRIOPROTETORES NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*)

1 RESUMO

A criopreservação seminal permite a conservação em longo prazo dos gametas de diversas espécies, inclusive as de interesse para aquicultura, como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Entretanto, a aplicação dessa biotecnologia pode causar efeitos deletérios aos espermatozoides, diminuindo a qualidade seminal pós-descongelamento. Assim, tem-se buscado a melhor composição de soluções diluidoras que possam reduzir os danos causados por esse processo e melhorar a qualidade do sêmen criopreservado. Objetivou-se a avaliação do uso de três crioprotetores em diferentes concentrações, e a sua associação com três antioxidantes, sobre a qualidade do sêmen criopreservado de *Pseudoplatystoma corruscans*. O estudo foi conduzido em dois experimentos. No primeiro experimento, amostras de sêmen de nove animais foram diluídas em nove meios de congelamento diferentes, compostos de dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) ou metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%). No segundo experimento, amostras de sêmen de cinco animais foram diluídas em oito meios de congelamento compostos de BTS a 5% e MeOH a 7,5% (menor concentração e melhor crioprotetor encontrado no primeiro experimento), associados a ausência ou presença de três antioxidantes, trealose (100 mM), ácido ascórbico (1 mM) e α -tocoferol (0,1 mM). Em ambos experimentos, as amostras de sêmen criopreservado foram submetidas às análises de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial. No primeiro experimento, o sêmen criopreservado com metanol apresentou valores para duração e taxa de motilidade maiores ($p < 0,05$) comparado com o DMSO e DMA. Para os outros parâmetros não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os crioprotetores. No segundo experimento, os antioxidantes presentes na solução diluidora proporcionaram taxa de motilidade maior ($p < 0,05$) em relação a solução sem antioxidantes. Para os outros parâmetros, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) em relação à solução sem antioxidantes. Para os parâmetros de duração e taxa de motilidade foi observada interação significativa ($p < 0,05$) entre o ácido ascórbico e o α -tocoferol. Assim, a adição de trealose (100mM), ácido ascórbico (1mM) e α -tocoferol (0,1mM) em conjunto com o metanol (7,5%) proporcionou a melhoria na taxa de motilidade do sêmen criopreservado em pintado.

Palavras-chave: peixe nativo, siluriforme, criopreservação, espermatozoide, trealose, ácido ascórbico, α -tocoferol.

2 ABSTRACT

Semen cryopreservation allows the long-term preservation of gametes of several species, including those of interest to aquaculture, such as the spotted catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*). However, the use of this biotechnology can cause negative effects to the spermatozoa, reducing semen quality after thawing. Thus, discovering the best composition extenders can reduce the damages caused by this process and improve the cryopreserved sperm quality. The objective of this study was to evaluate the use of three cryoprotectants in different concentrations and three antioxidants, and their effects on the quality of cryopreserved semen of *Pseudoplatystoma corruscans*. The study was conducted with two experiments. In the first experiment, semen samples from nine animals were diluted in nine different freezing media, composed of dimethylacetamide (DMA), dimethylsulfoxide (DMSO) or methanol (MeOH) in different concentrations (5%, 7.5% and 10%). In the second experiment, semen samples of five animals were diluted in eight freezing media composed of 5% BTS and 7.5% MeOH (better cryoprotectant evaluated in the first experiment), associated with the absence or presence of three antioxidants, trehalose (100 mM), ascorbic acid (1 mM) and α -tocopherol (0.1 mM). In both experiments, the samples of cryopreserved semen were submitted to the analysis of spermatocinetics, membrane integrity and mitochondrial potential. In the first experiment, the cryopreserved semen with methanol presented higher values ($p < 0.05$) for latency time and motility rate compared to DMSO and DMA. For the other parameters no differences ($p > 0.05$) were observed between the cryoprotectants. In the second experiment, the antioxidants present in the dilution solution provided a higher motility rate ($p < 0.05$) compared to the antioxidant-free solution. In other parameters, no differences ($p > 0.05$) were related to the antioxidant-free solution. For the parameters of latency time and motility rate, a significant interaction ($p < 0.05$) was observed between ascorbic acid and α -tocopherol. In conclusion, the addition of trehalose (100mM), ascorbic acid (1mM) and α -tocopherol (0.1mM) to the extender media together with the cryoprotectant methanol (7.5%) improved the motility of spotted catfish cryopreserved sperm.

Keywords: native fish, cryopreservation, spermatozoa, trehalose, ascorbic acid, α -tocopherol.

3 INTRODUÇÃO

O pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) é um peixe de água doce, nativo das bacias dos rios São Francisco e Paraná, com grande importância na pesca e aquicultura, no Brasil e em outros países sul-americanos (BRITO e BAZZOLI, 2003; BARZOTTO et al., 2017). Pertence à ordem Siluriforme e a família Pimelodidae, família que agrupa os bagres surubins de interesse para a criação comercial. Na aquicultura, o pintado também é utilizado, na produção de peixes híbridos com outros bagres, como o cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e o jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*), que favorecem a produção aquícola, mas por outro lado apresentam risco para as populações naturais (SAINT-PAUL, 2017; YABU et al., 2018).

A criopreservação de sêmen de peixes é uma importante ferramenta para o desenvolvimento da aquicultura, facilitando o manejo da reprodução, a sincronização da disponibilidade dos gametas, e a troca de material genético entre as fazendas de peixes. Ao mesmo tempo, pode contribuir para a conservação de recursos genéticos e a manutenção da variabilidade das espécies nos ambientes naturais (CAROSFELD et al., 2003; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017). Mas as grandes variações de protocolos entre as várias espécies de peixes, limitam a sua aplicação em escala comercial (GARCIA et al., 2016; ASTURIANO et al., 2017).

No processo de congelamento e descongelamento, os espermatozoides são expostos a condições extremas de temperatura e de pressão osmótica, sofrendo danos nas suas estruturas e funções, afetando a motilidade e sobrevivência espermática (CABRITA et al., 2014; JANG et al., 2017). Para proteger

as células, são utilizadas soluções diluidoras contendo agentes crioprotetores com a função de minimizar os efeitos negativos do choque térmico e estresse osmótico na viabilidade celular (VIVEIROS et al., 2015; ELLIOTT et al., 2017).

A glicose é o crioprotetor não-permeável mais utilizado em peixes, seja em soluções simples a 5%, ou em soluções com outros sais, associadas ou não, com leite em pó ou gema de ovo. Nos peixes siluriformes, os crioprotetores permeáveis mais frequentes são o metanol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o dimetilacetamida (DMA), geralmente a 10% (CAROSFELD et al., 2003; VIVEIROS, 2011).

Durante a criopreservação, além do choque térmico e do estresse osmótico, as células espermáticas também sofrem os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos oxidativos às estruturas celulares (SARASWAT et al., 2016). Quando a produção de EROs é maior que a sua metabolização ocorre o estresse oxidativo, afetando principalmente as membranas celulares dos espermatozoides, que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados e mais sensível à peroxidação lipídica (BOBE e LABBÉ, 2010; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012a).

O sêmen dos peixes possui sistemas naturais de defesa antioxidante, compostos por enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx); e por substâncias como as vitaminas C e E, o ácido úrico, a cisteína (LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER et al., 2010; SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ et al., 2013). No entanto, com a diluição do sêmen, a concentração dos antioxidantes diminui, reduzindo a ação desses sistemas naturais, que *in vitro* são lentos e menos eficientes na proteção dos espermatozoides contra os EROs (LAHNSTEINER et al., 2010; SARASWAT et al., 2016).

A utilização de antioxidantes exógenos nos diluidores de sêmen foi avaliada em várias espécies animais, especialmente em bovinos, suínos e equinos (TARIQ et al., 2015). Estudos realizados em algumas espécies de peixe apresentaram resultados com efeitos positivos e negativos, dependendo da substância, da concentração e da espécie de peixe avaliada (CABRITA et al., 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012b, NAVARRO et al., 2014; LIU et al., 2015).

Existem na literatura apenas dois relatos sobre a criopreservação de sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), no entanto as informações ainda são insuficientes para o estabelecimento de um protocolo eficiente para a espécie (CAROSFELD et al., 2003; VELAVERDE, 2013).

Objetivou-se avaliar os efeitos de três agentes crioprotetores em diferentes concentrações, e de três substâncias antioxidantes na melhoria da qualidade espermática pós-descongelamento de sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização

Os experimentos foram realizados durante o terço final da estação reprodutiva, em janeiro e fevereiro de 2017, nas instalações da piscicultura Cia do Peixe, localizada no município de Cidade Ocidental, estado de Goiás, região central do Brasil, coordenadas geográficas 16°08'52"S, 47°49'01"W.

4.2 Seleção dos animais e coleta de sêmen

Durante a estação reprodutiva, doze machos de pintado com idade entre 18 e 36 meses que apresentavam sinais de maturação sexual, como a papila urogenital hiperêmica e a presença de sêmen ao toque da região ventral, foram marcados individualmente com microchip (Veritag, MicroChipBrasil, Brasil) inserido na musculatura da região dorsal e mantidos em viveiros escavados de terra, com renovação diária de água e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial extrusada com 32% de proteína bruta.

No dia da coleta, os peixes previamente selecionados quanto à maturação sexual, foram medidos para peso corporal, sendo transferidos para tanques de alvenaria de 2.000 litros com renovação constante de água e temperatura média da água de $26 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Os animais estavam apresentando espermiacção espontânea, não sendo necessário o tratamento de indução hormonal.

No momento da coleta, os peixes foram contidos com toalha de algodão e a papila urogenital foi cuidadosamente limpa e seca com papel absorvente, sendo massageados na região ventral, no sentido anteroposterior para a liberação do sêmen. A coleta do sêmen foi feita em tubos plásticos graduados, com o cuidado de evitar a contaminação com água, urina e fezes.

O procedimento da coleta de sêmen foi realizado de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de Brasília, protocolo nº 147533/2015.

4.3 Avaliação da qualidade do sêmen fresco

Imediatamente após a coleta, as amostras foram avaliadas quanto à ativação prévia, em lâmina de vidro visualizada em microscópio ótico (Opton Anatomics, Brasil) no aumento de 400 vezes. As amostras com a presença de espermatozoides móveis foram descartadas.

Em seguida, foram avaliados os parâmetros de motilidade das amostras, colocando uma alíquota de 1 μ L de sêmen em lâmina de vidro seguida da adição de 25 μ L de solução ativadora de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1% (1:25; v/v), coberta com lamínula, e imediatamente visualizadas em microscópio ótico (Opton Anatomics, Brasil) no aumento de 400 vezes, em temperatura ambiente. A taxa de motilidade foi calculada avaliando o percentual de espermatozoides com movimentos progressivos, alternando os campos durante a análise. Na mesma lâmina foi avaliada a duração da motilidade, em segundos com o uso de cronômetro manual.

Nos experimentos foram utilizadas apenas as amostras de sêmen que apresentaram taxa de motilidade espermática acima de 70%, e ausência de contaminações ou ativação prévia.

As análises de motilidade espermática para as amostras de sêmen fresco foram realizadas nas instalações da piscicultura Cia do Peixe.

4.4 Experimento 1 - Crioprotetores permeáveis

No experimento 1, na avaliação dos efeitos dos agentes crioprotetores foram utilizadas as amostras de sêmen de nove animais (n=9). Como diluidor padrão

foi adotada uma solução de BTS (*Beltsville Thawing Solution* - Minitube, Alemanha) a 5% (p:v), sendo a glicose como crioprotetor não-permeável, associada a um crioprotetor permeável. Foram avaliados três crioprotetores permeáveis: dimetilacetamida (DMA - Dinâmica, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), e metanol (MeOH - Dinâmica, Brasil), em três diferentes concentrações, 5%, 7,5% e 10% (v:v), formando nove soluções diluidoras, caracterizando assim nove tratamentos:

- . Solução 1 (DMA 5%) - 5 g de BTS, 5 mL de dimetilacetamida, 85 mL de água destilada.
- . Solução 2 (DMA 7,5%) - 5 g de BTS, 7,5 mL de dimetilacetamida, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 3 (DMA 10%) - 5 g de BTS, 10 mL de dimetilacetamida, 80 mL de água destilada.
- . Solução 4 (DMSO 5%) - 5 g de BTS, 5 mL de dimetilsulfóxido, 85 mL de água destilada.
- . Solução 5 (DMSO 7,5%) - 5 g de BTS, 7,5 mL de dimetilsulfóxido, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 6 (DMSO 10%) - 5 g de BTS, 10 mL de dimetilsulfóxido, 80 mL de água destilada.
- . Solução 7 (MeOH 5%) - 5 g de BTS, 5 mL de metanol, 85 mL de água destilada.
- . Solução 8 (MeOH 7,5%) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 9 (MeOH 10%) - 5 g de BTS, 10 mL de metanol, 80 mL de água destilada.

As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 10% de sêmen e 90% de solução diluidora com crioprotetor (1:9, v/v), sendo estabelecidos nove tratamentos. As soluções foram preparadas no dia da coleta com antecedência de duas horas. As concentrações foram ajustadas para manterem as concentrações finais dos crioprotetores em 5%, 7,5% e 10% (v:v), mesmo após a diluição com o sêmen.

Após as diluições, as amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL (Minitube, Alemanha), identificadas por animal e por tratamento. As extremidades abertas das palhetas foram seladas com álcool polivinílico em pó (Minitube, Alemanha). No total, foram preparadas 324 palhetas, sendo nove machos, nove tratamentos e quatro palhetas réplicas por tratamento. Os tratamentos foram aplicados em todos os animais.

4.5 Experimento 2 - Antioxidantes não-enzimáticos

No experimento 2, na avaliação dos efeitos das substâncias antioxidantes foram utilizadas as amostras de sêmen de cinco animais (n=5). Como diluidor padrão foi adotada uma solução de BTS (Belts Beltsville Thawing Solution - Minitube, Alemanha) a 5% (p:v) com metanol a 7,5%, agente crioprotetor selecionado de acordo com os resultados obtidos no experimento 1. Ao diluidor padrão foram acrescentadas três substâncias antioxidantes, o α -tocoferol (acetato de α -tocoferol, Farmacotécnica, Brasil), o ácido ascórbico (L-ácido ascórbico, Farmacotécnica, Brasil), e a trealose (Dinâmica, Brasil), respectivamente em três concentrações, 0,1mM, 1mM e 100mM, formando oito soluções diluidoras combinando a ausência ou a presença de substâncias antioxidantes:

- . Solução 1 (BTS) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 2 (Vit C) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 17,6 mg de ácido ascórbico, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 3 (Vit E) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 4,7 mg de α -tocoferol, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 4 (Vit C + Vit E) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 17,6 mg de ácido ascórbico, 4,7 mg de α -tocoferol, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 5 (Trealose) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 3,42 g de trealose, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 6 (Trealose + Vit C) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 3,42 g de trealose, 17,6 mg de ácido ascórbico, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 7 (Trealose + Vit E) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 3,42 g de trealose, 4,7 mg de α -tocoferol, 82,5 mL de água destilada.
- . Solução 8 (Trealose + Vit C + Vit E) - 5 g de BTS, 7,5 mL de metanol, 3,42 g de trealose, 17,6 mg de ácido ascórbico, 4,7 mg de α -tocoferol, 82,5 mL de água destilada.

As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 10% de sêmen e 90% de solução diluidora com crioprotetor (1:9, v/v), sendo estabelecidos oito tratamentos: BTS sem antioxidantes (BTS), BTS com ácido ascórbico (Vit C), BTS com α -tocoferol (Vit E), BTS com trealose (Trealose), BTS com ácido ascórbico e α -tocoferol (Vit C + Vit E), BTS com trealose e ácido ascórbico (Trealose + Vit C), BTS com trealose e α -tocoferol (Trealose + Vit E), e BTS com trealose, ácido ascórbico e

α -tocoferol (Trealose + Vit C + Vit E). As soluções foram preparadas no dia da coleta com antecedência mínima de duas horas. As concentrações do crioprotetor e dos antioxidantes foram ajustadas para manterem as concentrações finais do metanol em 7,5% (v:v), do α -tocoferol em 0,1 mM, do ácido ascórbico em 1mM e da trealose em 100mM, mesmo após a diluição com o sêmen.

Após as diluições, as amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL (Minitube, Alemanha), identificadas por animal e por tratamento. As extremidades abertas das palhetas foram seladas com álcool polivinílico em pó (Minitube, Alemanha). No total, foram preparadas 160 palhetas, sendo cinco machos, oito tratamentos e quatro palhetas réplicas por tratamento. Os tratamentos foram aplicados em todos os animais.

4.6 Congelamento e descongelamento do sêmen

Nos dois experimentos, após o envase, as palhetas foram acondicionadas em raques de alumínio e mantidas por 10 minutos em equilíbrio na temperatura ambiente (26 a 28 °C). Em seguida as amostras foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (CryoFarm, YDH-3/50, Savigliano, Itália) a taxa de 35°C min⁻¹, com estabilização gradual até -180°C, em aproximadamente 5 minutos. Depois de 24 horas, as amostras foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (MVE, Millennium 2000 XC-20, Geórgia, EUA) em temperatura de -196°C, onde foram mantidas por no mínimo 30 dias.

Para a avaliação das amostras, as palhetas contendo o sêmen criopreservado foram descongeladas uma de cada vez, em banho-maria com água aquecida na temperatura de 40°C, agitando levemente por 12 segundos. Após o descongelamento a palheta foi cuidadosamente seca com papel toalha. A extremidade selada foi cortada e o conteúdo transferido para um tubo plástico de 1,5mL, com o auxílio de uma haste de metal empurrando o êmbolo. Imediatamente após o descongelamento, foram procedidas as análises de qualidade do sêmen criopreservado.

4.7 Análise objetiva da motilidade espermática

A motilidade total e velocidades espermáticas foram avaliadas para as amostras de sêmen descongelado, nos dois experimentos, através do sistema de análise de sêmen computadorizada (CASA) IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, EUA). Foi utilizada uma configuração previamente ajustada para a análise de espermatozoides de peixes siluriformes. Os parâmetros de entrada utilizados na configuração do sistema foram:

Image Capture

Rate: 60 Hz, Frames Acquired: 100;

Cell Detection

Minimum Contrast: 70; Minimum Cell Size: 1 Pixels;

Default

Cell Size: 6 Pixels; Cell Intensity: 106 ;

Progressive Cells

Min VAP: 40,0 $\mu\text{m/s}$; Straightness (STR): 70,0 %;

Slow cells

VAP Cutoff: 20,0 $\mu\text{m/s}$; VSL Cutoff: 3,0 $\mu\text{m/s}$;

Slow Cells Motile: YES.

Antes da avaliação, a amostra de sêmen descongelado foi diluída duas vezes. Na primeira diluição, 100 μL de sêmen foram diluídos em 100 μL de solução de BTS pura para reduzir os efeitos tóxicos dos crioprotetores. Na segunda diluição foi realizada a ativação da motilidade espermática, adicionando 15 μL do sêmen diluído em tubo plástico previamente preparado com 300 μL de solução ativadora de NaHCO_3 a 1%.

Após a homogeneização, uma alíquota de 10 μL foi transferida para lâmina Makler (Makler, Santa Ana, EUA) inserida no CASA previamente ajustado e mantida em temperatura ambiente. Em seguida foram selecionados manualmente três campos para leitura e iniciada a gravação da análise que ocorreu entre 10 e 15 segundos após a ativação do sêmen, com no mínimo 1.000 espermatozoides avaliados por amostra. Na mesma lâmina, para cada amostra foi avaliada a duração da motilidade do sêmen em segundos, com cronômetro manual.

Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram a motilidade total (%); a velocidade curvilínea (VCL), em $\mu\text{m s}^{-1}$; a velocidade linear (VSL), em $\mu\text{m s}^{-1}$; a velocidade média da trajetória (VAP), em $\mu\text{m s}^{-1}$; e a frequência de batimentos do flagelo (BCF), em Hz.

As análises de motilidade e cinética espermática foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

4.8 Análise da viabilidade celular por sondas fluorescentes

Nos dois experimentos, as avaliações de potencial mitocondrial e integridade de membrana do sêmen descongelado foram feitas através da associação de corantes fluorescentes em citômetro de fluxo AMNIS FlowSight (AmnisCorp., Seattle, EUA). Os corantes fluorescentes utilizados foram o Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MI), o iodeto de propídeo (Molecular Probe, Eugene, EUA), e o Mitotracker Green (Molecular Probe, Eugene, EUA).

Inicialmente, 50 μL de sêmen foram diluídos em 200 μL de solução solução de formol salina tamponada, e posteriormente incubados no escuro por 30 minutos, em solução composta de 400 μL de citrato de sódio a 3%, 200 μL solução de Hoechst 33342 (5g L^{-1}), 1 μL de Mitotracker Green (1mM) e 6 μL de iodeto de propídeo ($0,5\text{mg L}^{-1}$).

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática foi utilizado o iodeto de propídeo, e os sinais emitidos foram captados pelo canal 4 (595- 642 nm) e excitados através do laser 488 a 10 mW. O potencial mitocondrial foi avaliado utilizando o MitoTracker Green, com sinais captados através do canal 2 (505-560 nm) e excitados através do laser 488 a 10 mW. Para excluir possíveis debris celulares ou sujidades, foi utilizado o corante nuclear Hoechst 33342, com sinais captados. Para cada parâmetro, 10.000 eventos (células) foram adquiridos a cada momento/grupo e as imagens foram captadas por uma lente objetiva com ampliação de 40 vezes. As amostras foram adquiridas e analisadas através do software de aquisição IDEAS v6.1, AMNIS FlowSight (AmnisCorp., Seattle, WA). Para a coleta dos dados contendo apenas eventos compatíveis à espermatozoides, foi criado um padrão de aquisição próprio para espermatozoides de peixes. Os parâmetros de potencial mitocondrial e integridade de membrana foram expressos em % de células.

As análises de integridade de membrana e potencial mitocondrial foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

4.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi com blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial. Cada animal representando um bloco, e considerados como unidade experimental, onde foram aplicados os tratamentos. Os dados foram expressos em valores médios e desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do programa SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, EUA). Todos os valores foram testados quanto à distribuição normal dos resíduos, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Quando necessário, os valores em porcentagem foram transformados pela raiz quadrada do arcosseno. Os valores de taxa e duração de motilidade, velocidades de deslocamento, integridade de membrana e potencial mitocondrial, e as diferenças entre tratamentos (crioprotetores e antioxidantes) foram testados pela análise de variância (GLM) seguida pelo teste de Tukey. Para os fatores antioxidantes também foram avaliadas as interações quando existentes. Para todos os testes estatísticos foi utilizado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

As características corporais e espermáticas dos machos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) utilizados nos dois experimentos estão descritas na Tabela 1. A coleta foi realizada sem a indução hormonal dos animais e houve facilidade na obtenção do sêmen. No entanto, a contaminação com urina foi frequente, levando ao descarte das amostras de alguns animais. As amostras de sêmen fresco apresentaram coloração branca, baixa viscosidade e volume variável, sendo coletado no mínimo 1 mL de cada animal.

Tabela 1. Peso corporal e características de motilidade de sêmen fresco em machos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) mantidos em cativeiro

Características	Experimento 1	Experimento 2
.Peso corporal (g)	1.102 ± 257	1.114 ± 166
.Taxa de motilidade (%)	75,0 ± 4,3	77 ± 5,7
.Duração de motilidade (s)	125,7 ± 23,7	114,6 ± 18,1

Machos com idade entre 18 e 36 meses e coleta sem indução hormonal.

5.1 Experimento 1

Os efeitos dos tratamentos com os crioprotetores permeáveis, em diferentes concentrações, nos parâmetros de duração e motilidade espermática estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 1. Os valores observados nos tratamentos que utilizaram os crioprotetores metanol a 7,5% e metanol a 10%, foram

mais altos ($p < 0,05$) para taxa de motilidade espermática, quando comparados com demais crioprotetores e concentrações (Tabela 2 e Figura 1).

Para a duração da motilidade espermática, os valores observados com o metanol a 7,5% foram mais altos ($p < 0,05$), quando comparado com a maioria dos demais crioprotetores, sendo que não apresentou diferenças ($p > 0,05$) em relação aos tratamentos com metanol a 5% e DMSO a 5% (Tabela 2 e Figura 1). As menores médias para a duração e taxa da motilidade espermática foram observadas com o DMA a 10%, mas que não apresentou diferenças ($p > 0,05$) para os dois parâmetros em relação aos tratamentos com DMA a 5% e 7,5% e com DMSO a 7,5% e 10%.

Para os demais parâmetros de cinética espermática (Tabela 3 e Figura 2), e de viabilidade celular (Tabela 4 e Figura 3), os valores observados não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 2. Motilidade espermática total pós-descongelamento, em sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com três crioprotetores em diferentes concentrações

Tratamentos	Motilidade total (em %)	Duração (em segundos)
BTS + DMA 5%	8,16 ± 7,60 ^{cd}	45,33 ± 10,94 ^{cd}
BTS + DMA 7,5%	7,48 ± 3,87 ^{cd}	44,78 ± 4,74 ^{cd}
BTS + DMA 10%	5,56 ± 3,33 ^d	40,56 ± 5,92 ^d
BTS + DMSO 5%	14,90 ± 10,19 ^{bc}	54,33 ± 10,74 ^{abc}
BTS + DMSO 7,5%	13,60 ± 10,05 ^{bcd}	51,22 ± 9,56 ^{bcd}
BTS + DMSO 10%	11,08 ± 5,54 ^{bcd}	46,56 ± 5,61 ^{ab}
BTS + MeOH 5%	17,87 ± 10,27 ^b	57,22 ± 8,23 ^{ab}
BTS + MeOH 7,5%	30,30 ± 20,08 ^a	63,56 ± 7,30 ^a
BTS + MeOH 10%	32,38 ± 13,16 ^a	49,56 ± 9,88 ^{bcd}

BTS: *Beltsville Thawing Solution*, DMA: dimetilacetamida, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol. Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Cinética espermática pós-descongelamento, em sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com três crioprotetores em diferentes concentrações

Tratamentos	VCL (em $\mu\text{m s}^{-1}$)	VSL (em $\mu\text{m s}^{-1}$)	VAP (em $\mu\text{m s}^{-1}$)	BCF (em Hz)
BTS + DMA 5%	35,57 \pm 6,10	27,29 \pm 5,15	29,48 \pm 4,36	30,44 \pm 5,45
BTS + DMA 7,5%	35,53 \pm 5,14	26,44 \pm 5,23	29,53 \pm 4,13	29,60 \pm 5,36
BTS + DMA 10%	36,45 \pm 8,21	26,37 \pm 7,62	28,98 \pm 5,92	31,05 \pm 7,71
BTS + DMSO 5%	39,78 \pm 7,32	28,88 \pm 7,79	31,79 \pm 5,19	31,58 \pm 4,88
BTS + DMSO 7,5%	37,99 \pm 7,00	29,19 \pm 4,13	30,83 \pm 4,81	32,07 \pm 2,67
BTS + DMSO 10%	36,23 \pm 7,44	30,69 \pm 6,87	31,45 \pm 6,08	30,87 \pm 2,97
BTS + MeOH 5%	35,65 \pm 4,69	27,91 \pm 2,98	29,16 \pm 2,96	33,89 \pm 7,19
BTS + MeOH 7,5%	34,95 \pm 7,39	25,84 \pm 3,15	28,06 \pm 3,72	33,41 \pm 4,09
BTS + MeOH 10%	37,08 \pm 9,41	27,36 \pm 5,66	30,20 \pm 5,82	31,91 \pm 3,18

BTS: *Beltsville Thawing Solution*, DMA: dimetilacetamida, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol. VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média de trajetória; BCF: frequência de batimento flagelar. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Viabilidade celular pós-descongelamento, em sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com três crioprotetores em diferentes concentrações

Tratamentos	Integridade de membrana (em %)	Potencial mitocondrial (em %)
BTS + DMA 5%	6,07 ± 1,94	10,29 ± 9,03
BTS + DMA 7,5%	7,25 ± 4,67	10,11 ± 4,53
BTS + DMA 10%	11,75 ± 8,32	12,30 ± 7,46
BTS + DMSO 5%	6,82 ± 3,29	6,80 ± 4,31
BTS + DMSO 7,5%	12,76 ± 10,23	12,49 ± 11,07
BTS + DMSO 10%	6,69 ± 3,94	6,89 ± 3,59
BTS + MeOH 5%	7,76 ± 4,66	12,33 ± 13,20
BTS + MeOH 7,5%	9,25 ± 4,83	10,06 ± 7,06
BTS + MeOH 10%	7,93 ± 5,53	7,48 ± 4,15

BTS: *Beltsville Thawing Solution*, DMA: dimetilacetamida, DMSO: dimetilsulfóxido, MeOH: metanol. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

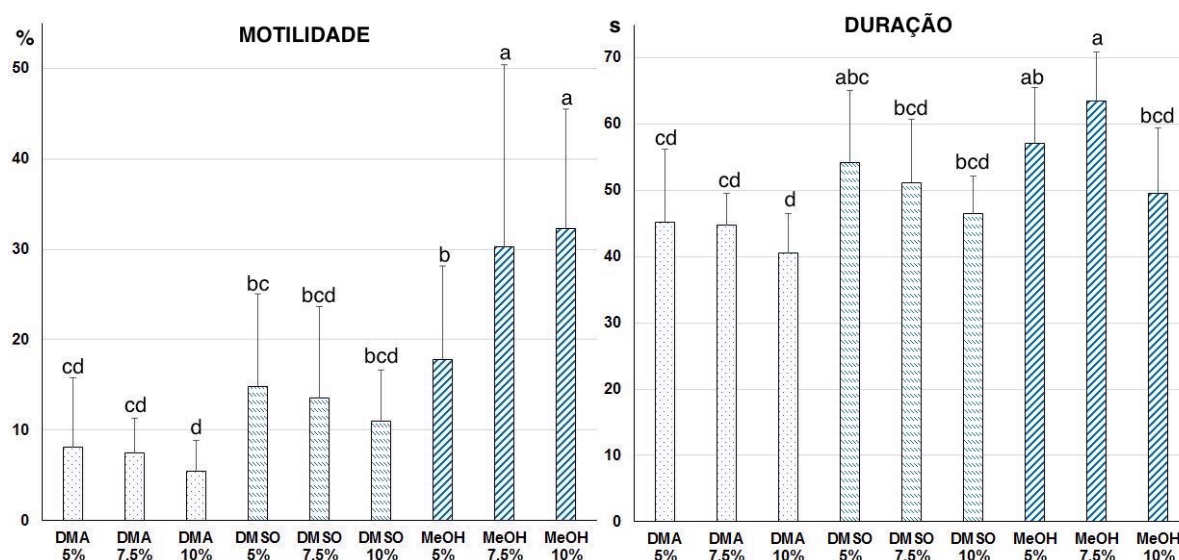


Figura 1. Duração e motilidade espermática pós-descongelamento, com três crioprotetores dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%). Letras diferentes mostram diferenças ($p<0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

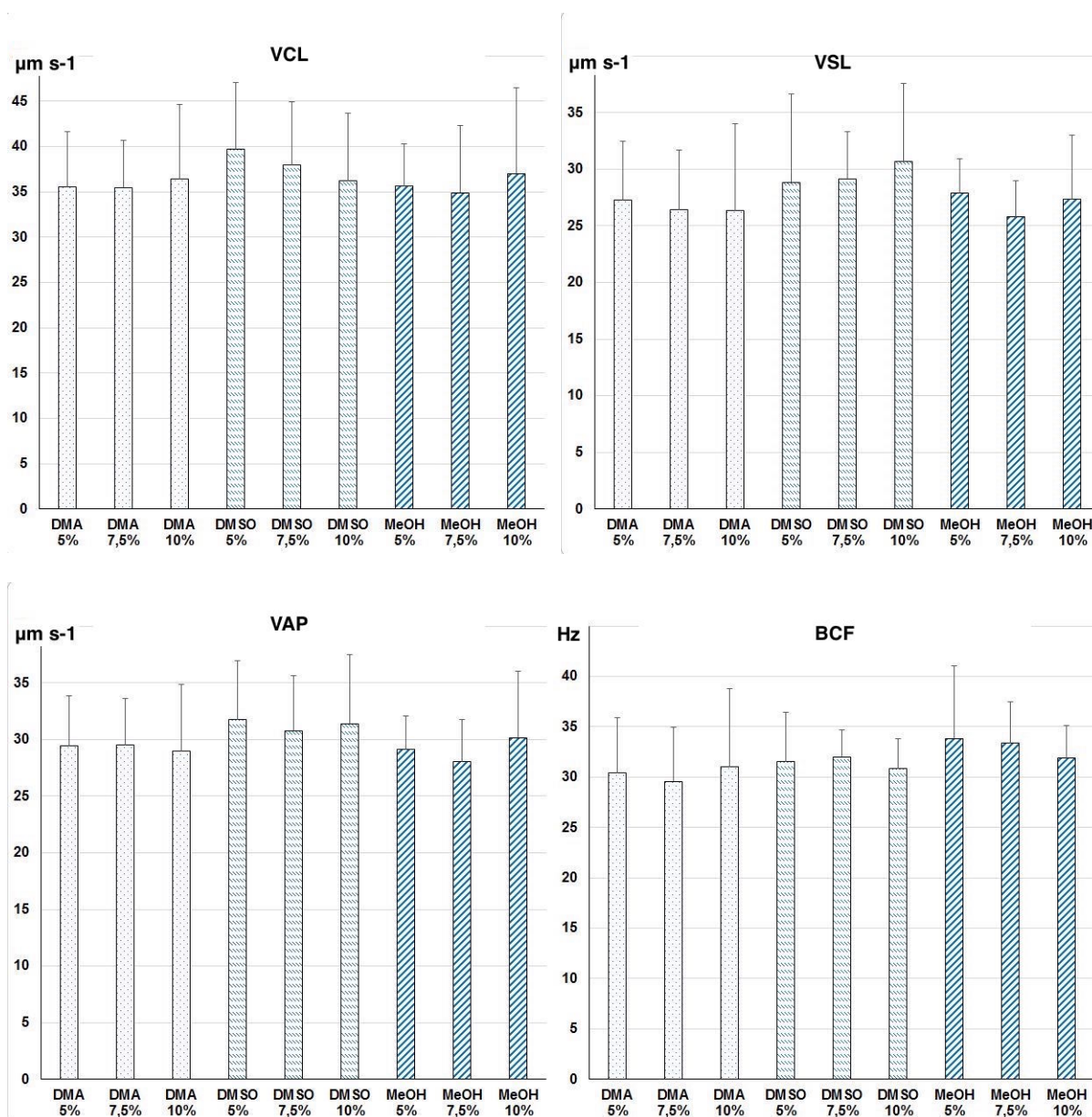


Figura 2. Cinética espermática pós-descongelamento, com três crioprotetores dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média de trajetória; BCF: frequência de batimento flagelar.

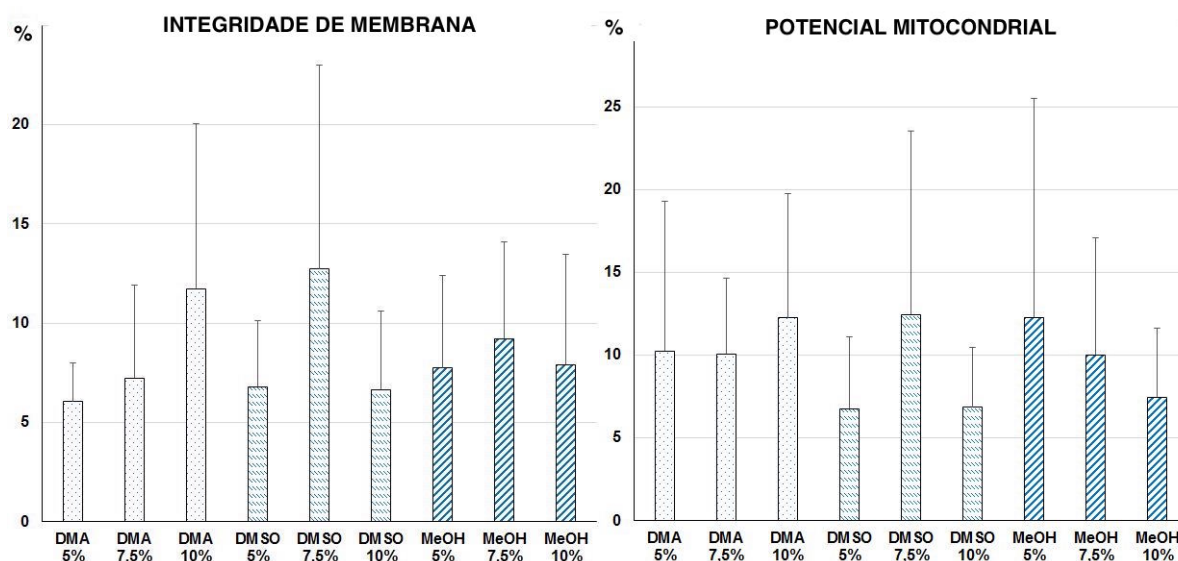


Figura 3. Viabilidade celular pós-descongelamento, com três crioprotetores dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

5.2 Experimento 2

Os efeitos dos diferentes tratamentos, com a presença ou ausência de antioxidantes exógenos, na duração e motilidade espermática estão apresentados na Tabela 5 e Figura 4. O tratamento da solução diluidora com associação dos três antioxidantes, trealose (100mM), ácido ascórbico (1mM) e α -tocoferol (0,1mM), proporcionou taxa de motilidade espermática maior ($p < 0,05$) em relação ao tratamento sem a presença de antioxidantes.

O mesmo tratamento também obteve resultados superiores ($p < 0,05$), em relação aos tratamentos com o ácido ascórbico (1mM) e o α -tocoferol (0,1mM) isolados, e com a trealose (100mM) associada ao ácido ascórbico (1mM) para de motilidade espermática (Tabela 5 e Figura 4).

Para o parâmetro de duração da motilidade espermática, o tratamento com os três antioxidantes associados apresentou valor mais alto ($p < 0,05$), quando comparada com as soluções com apenas um antioxidante isolado, ácido ascórbico (1mM), ou α -tocoferol (0,1mM), e trealose (100mM), conforme apresentado na Tabela 5. No entanto, não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) entre o tratamento sem antioxidantes quando comparado com os demais tratamentos com antioxidantes.

Na análise dos demais parâmetros de cinética espermática foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, entretanto não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) em relação à solução sem antioxidantes (Tabela 6 e Figura 5). As únicas exceções foram para os parâmetros de velocidade curvilínea (VCL), e velocidade linear (VSL), onde o tratamento com ácido ascórbico (1mM) isolado apresentou resultados mais baixos ($p < 0,05$) que o tratamento sem a presença de antioxidantes.

Para os parâmetros de viabilidade celular (Tabela 7 e Figura 6), os valores observados para integridade de membrana e potencial mitocondrial não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

Foi observada ainda a interação significativa ($p < 0,05$) entre os antioxidantes ácido ascórbico (1mM), e α -tocoferol (0,1mM), para os parâmetros de duração e taxa de motilidade (Tabela 5 e Figura 4). Para os demais parâmetros não foram detectadas interações ($p > 0,05$) entre os antioxidantes.

Tabela 5. Motilidade espermática total pós-descongelamento, em sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com três antioxidantes em diferentes concentrações

Tratamentos	Motilidade total (em %)	Duração (em segundos)
BTS	24,37 \pm 9,41 ^{bcd}	53,00 \pm 5,87 ^{ab}
BTS + Vit C	16,22 \pm 7,67 ^e	49,40 \pm 6,46 ^b
BTS + Vit E	21,71 \pm 19,34 ^{cde}	49,80 \pm 9,67 ^b
BTS + Vit C + Vit E	32,55 \pm 19,37 ^{abc}	59,40 \pm 5,27 ^{ab}
BTS + Trealose	30,13 \pm 25,95 ^{abcd}	52,20 \pm 11,60 ^b
BTS + Trealose + Vit C	19,49 \pm 16,14 ^{de}	53,80 \pm 9,57 ^{ab}
BTS + Trealose + Vit E	33,72 \pm 28,39 ^{ab}	58,80 \pm 4,26 ^{ab}
BTS + Trealose + Vit C + Vit E	36,01 \pm 22,69 ^a	65,40 \pm 4,56 ^a

BTS: *Beltsville Thawing Solution*; Vit C: ácido ascórbico a 1mM; Vit E: α -tocoferol a 0,1mM; Trealose a 100mM. Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Cinética espermática pós-descongelamento, em sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com três antioxidantes em diferentes concentrações

Tratamentos	VCL (em $\mu\text{m s}^{-1}$)	VSL (em $\mu\text{m s}^{-1}$)	VAP (em $\mu\text{m s}^{-1}$)	BCF (em Hz)
BTS	38,42 \pm 7,45 ^a	27,65 \pm 6,24 ^{ab}	28,83 \pm 7,60 ^{ab}	34,00 \pm 2,97 ^{ab}
BTS + Vit C	31,86 \pm 2,72 ^b	24,77 \pm 2,29 ^c	26,20 \pm 1,94 ^b	32,49 \pm 3,56 ^b
BTS + Vit E	36,07 \pm 5,20 ^{ab}	28,41 \pm 4,69 ^{ab}	30,18 \pm 4,15 ^a	33,83 \pm 2,95 ^{ab}
BTS + Vit C + Vit E	35,54 \pm 4,53 ^{ab}	27,41 \pm 2,69 ^{abc}	30,26 \pm 3,21 ^a	33,91 \pm 3,48 ^{ab}
BTS + Trealose	36,83 \pm 5,31 ^a	25,88 \pm 2,09 ^{bc}	28,39 \pm 2,61 ^{ab}	35,61 \pm 4,72 ^a
BTS + Trealose + Vit C	38,38 \pm 7,62 ^a	29,24 \pm 4,30 ^a	31,07 \pm 5,07 ^a	34,82 \pm 3,87 ^{ab}
BTS + Trealose + Vit E	36,72 \pm 9,81 ^a	28,02 \pm 4,34 ^{ab}	30,16 \pm 4,32 ^a	33,92 \pm 4,49 ^{ab}
BTS + Trealose + Vit C + Vit E	36,08 \pm 3,56 ^{ab}	26,99 \pm 2,70 ^{abc}	29,29 \pm 3,02 ^{ab}	34,85 \pm 3,18 ^{ab}

BTS: *Beltsville Thawing Solution*; Vit C: ácido ascórbico a 1mM; Vit E: α -tocoferol a 0,1mM; Trealose a 100mM. VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média de trajetória; BCF: frequência de batimento flagelar. Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

Tabela 7. Viabilidade celular pós-descongelamento, em sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com três antioxidantes em diferentes concentrações

Tratamentos	Integridade de membrana (em %)	Potencial mitocondrial (em %)
BTS	20,20 ± 7,75	20,25 ± 5,49
BTS + Vit C	17,02 ± 6,81	15,49 ± 7,06
BTS + Vit E	17,02 ± 9,70	13,04 ± 5,82
BTS + Vit C + Vit E	20,70 ± 13,40	13,10 ± 7,66
BTS + Trealose	19,94 ± 9,71	13,91 ± 8,50
BTS + Trealose + Vit C	19,07 ± 14,90	17,08 ± 15,29
BTS + Trealose + Vit E	18,45 ± 13,45	16,53 ± 16,12
BTS + Trealose + Vit C + Vit E	20,39 ± 12,07	14,26 ± 13,61

BTS: *Beltsville Thawing Solution*; Vit C: ácido ascórbico a 1mM; Vit E: α -tocoferol a 0,1mM; Trealose a 100mM. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

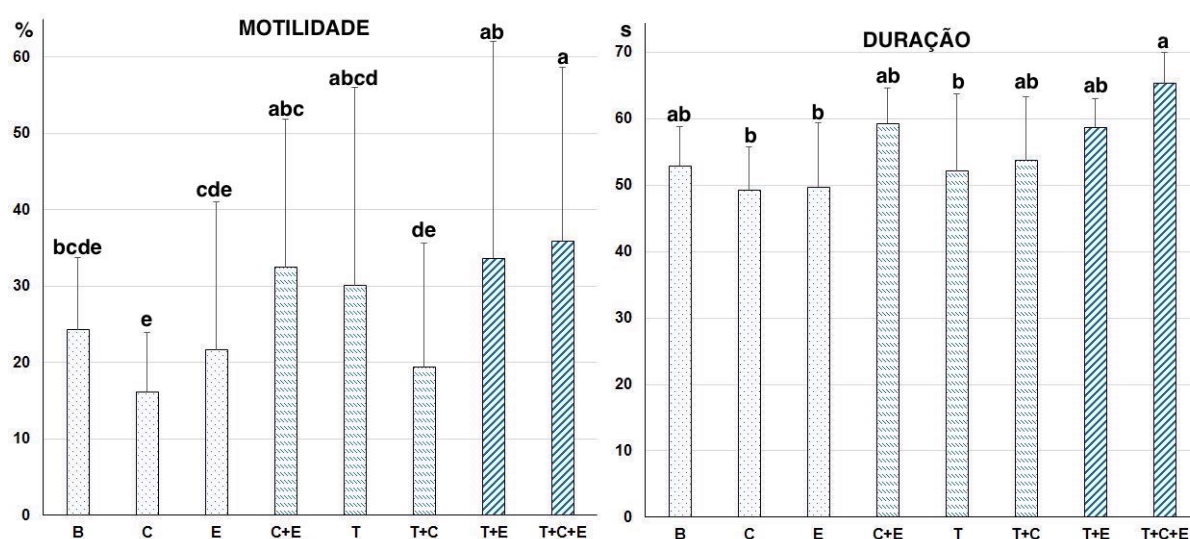


Figura 4. Duração e motilidade espermática pós-descongelamento com BTS (B) e três antioxidantes combinados entre si, ácido ascórbico 1mM (C), α -tocoferol 0,1mM (E) e trealose 100mM (T). Letras diferentes mostram diferenças ($p<0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

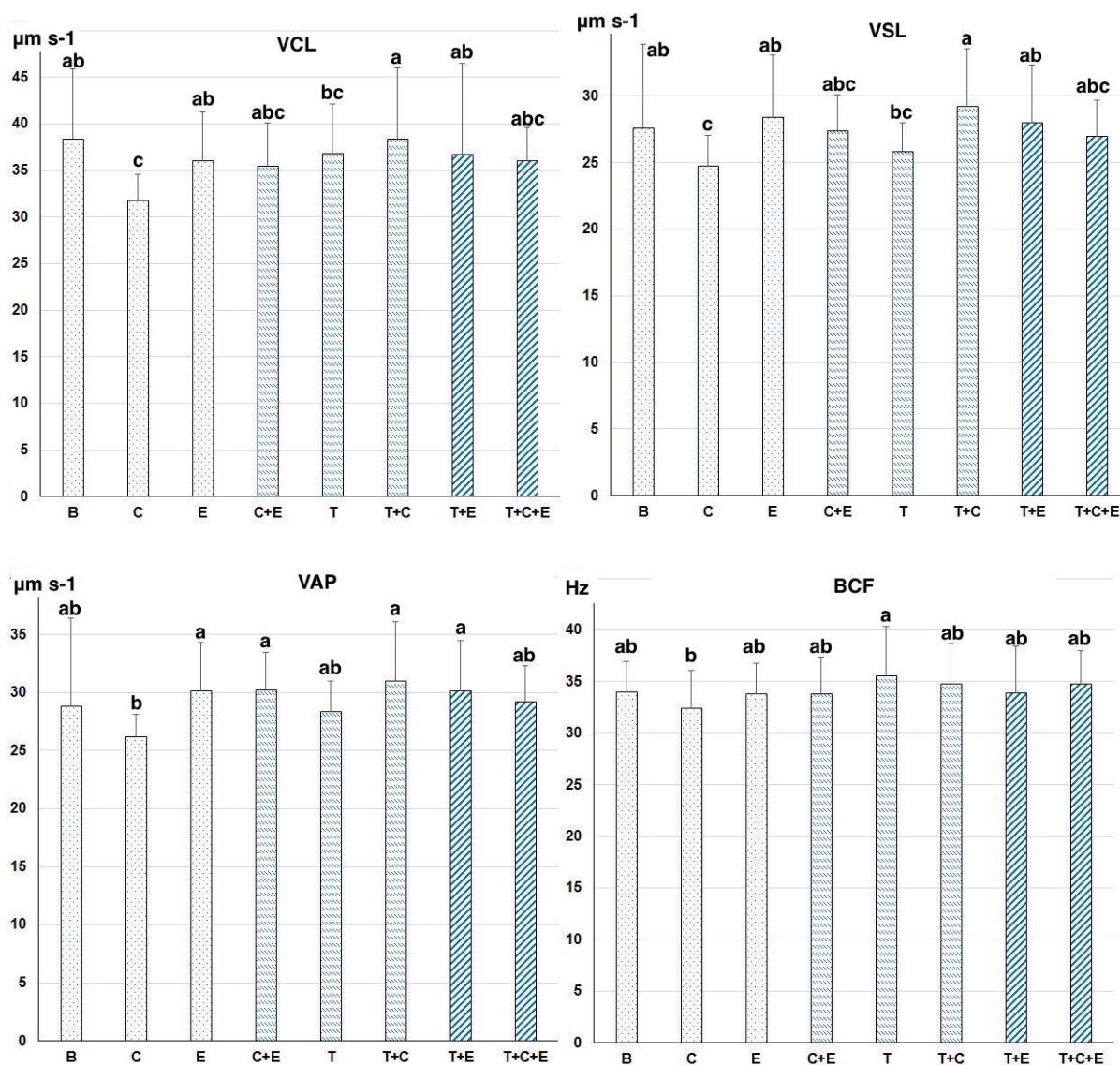


Figura 5. Cinética espermática pós-descongelamento com BTS (B) e três antioxidantes combinados entre si, ácido ascórbico 1mM (C), α -tocoferol 0,1mM (E) e trealose 100mM (T). Letras diferentes mostram diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média de trajetória; BCF: frequência de batimento flagelar.

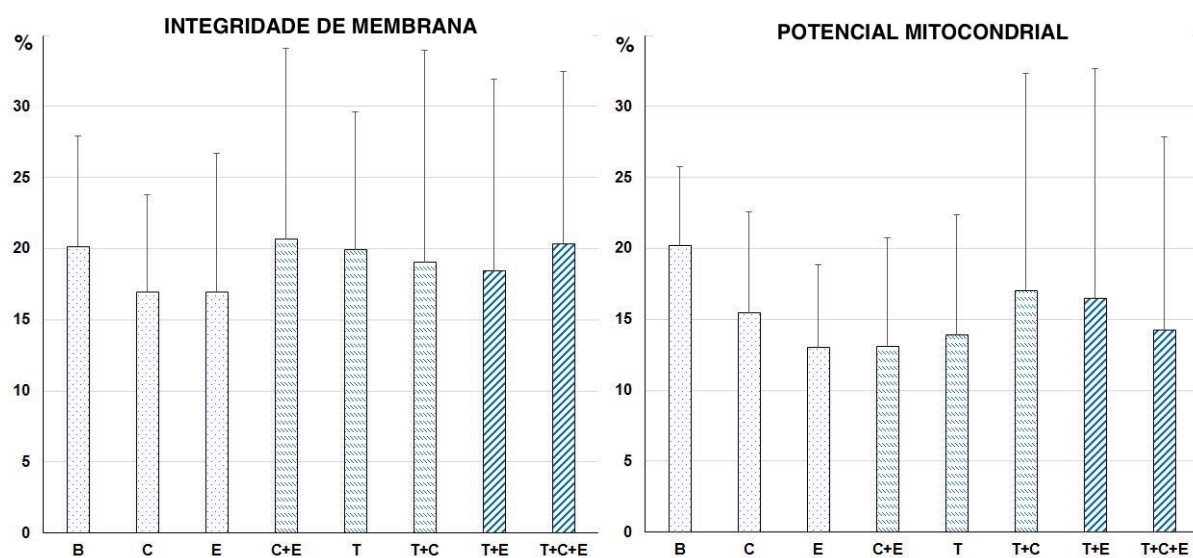


Figura 6. Viabilidade celular pós-descongelamento com BTS (B) e três antioxidantes combinados entre si, ácido ascórbico 1mM (C), α -tocoferol 0,1mM (E) e trealose 100mM (T). Não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos, pelo teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Os machos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) utilizados nos experimentos apresentaram facilidade na liberação do sêmen, mas da mesma forma como foi descrito por Velaverde (2013), a contaminação das amostras com urina ocorreu com frequência. A liberação espontânea de sêmen observada na espécie, é distinta da maioria dos machos nos peixes siluriformes, nos quais a espermição sem o uso de indução hormonal é rara, sendo necessário a extração dos testículos em algumas espécies (VIVEIROS, 2011).

Os valores que foram obtidos para a duração da motilidade espermática, tanto para o sêmen fresco (114 e 125 segundos) como para o sêmen criopreservado (44 a 65 segundos), estão acima dos que foram descritos para o sêmen fresco (30 a 32 segundos) por Velaverde (2013). As variações encontradas para o sêmen de peixes migratórios estão relacionadas ao grau de domesticação dos reprodutores, uso de indução hormonal e período dentro da estação reprodutiva (MURGAS et al., 2014; BROWNE et al., 2015; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017).

Além disso, os valores mais altos de duração de motilidade espermática observados em comparação com os observados por Velaverde (2013), forma influenciados pela solução ativadora utilizada. Nos peixes siluriformes, a solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1% apresenta melhores resultados de duração e taxa de motilidade espermática (CAROSFELD et al., 2003; MURGAS et al., 2014). A osmolaridade do meio aquático e a resposta das células ao estresse osmótico influenciam no início e na duração da motilidade (BROWNE et al., 2015).

No presente estudo, os resultados obtidos na criopreservação com a utilização do crioprotetor metanol nas concentrações de 7,5% e 10%, confirmam as informações descritas previamente para a espécie. Nos primeiros relatos da criopreservação de sêmen do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), as soluções diluidoras de glicose a 5%, associadas ao metanol a 10% e leite em pó a 15%, foram mais efetivas do que DMSO a 10% (CAROSFELD et al., 2003).

Resultados semelhantes foram descritos para o bagre africano (*Clarias gariepinus*), onde o metanol apresentou menor toxidez do que o DMSO, em concentrações acima de 15% (VIVEIROS, 2011), enquanto que no jundiá cinza (*Rhandia quelen*) o uso de metanol a 10% já está estabelecido com sucesso (ADAMES et al., 2015). O metanol possui menor peso molecular e permeabilidade celular mais rápida quando comparado com DMSO e o DMA (ELLIOTT et al., 2017).

A redução dos parâmetros de duração e taxa de motilidade observados no presente estudo, quando foram utilizados os crioprotetores DMA e DMSO, demonstram a maior sensibilidade das células espermáticas do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) na presença desses dois agentes crioprotetores permeáveis. Por outro lado, Velaverde (2013) utilizou os crioprotetores DMA e DMSO, a 8 e 10%, associados a gema de ovo, e obteve resultados positivos na criopreservação do sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

Nesse sentido, Carosfeld et al. (2003) citaram o benefício da associação de crioprotetores permeáveis com crioprotetores não-permeáveis, como a gema de ovo e o leite em pó, em algumas espécies de peixes brasileiros. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a viabilidade da criopreservação do sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) sem a necessidade do uso do leite em pó ou da gema de ovo. A avaliação da utilização de soluções diluidoras mais simples, como no estudo atual, tem o objetivo de estabelecer protocolos de criopreservação mais objetivos, acompanhando o que vem pesquisados resultados em tambaqui (*Colossoma macropomum*), curimba (*Prochilodus lineatus*), piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*) e em outras espécies nativas (GARCIA et al., 2015; VARELA JR et al., 2015; VIVEIROS et al., 2015; FELIZARDO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016).

Na avaliação do uso de antioxidantes na criopreservação do sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), apenas a solução diluidora que possuía ao mesmo tempo as três substâncias antioxidantes (trealose-100mM, ácido ascórbico-1mM, α -tocoferol-0,1mM), foi a que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para o parâmetro de taxa de motilidade espermática, em relação a solução diluidora sem os antioxidantes. Para o parâmetro de duração de motilidade, a solução com os três antioxidantes, apresentou valores mais longos ($p < 0,05$) em relação às soluções com a presença de apenas um dos antioxidantes. Os resultados demonstraram que a associação das substâncias antioxidantes potencializou os seus efeitos sobre a qualidade do sêmen descongelado.

Para os parâmetros de duração e motilidade espermática foram observadas interações significativas entre o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E), sendo que foram observados valores mais altos nos tratamentos onde os dois antioxidantes estavam associados. A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que além da peroxidação lipídica, combate a oxidação das proteínas e do DNA, atuando na fase aquosa das células. Enquanto que a vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que atua diretamente na proteção dos lipídeos das membranas celulares contra as reações de peroxidação. A vitamina C atua sinergicamente com a vitamina E, regenerando os radicais tocoferil em tocoferol, e tem papel na manutenção de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a glutadiona peroxidase (GPX), essenciais para a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos pelo metabolismo espermático (NAVARRO et al., 2009; TARIQ et al., 2015; SARASWAT et al., 2016).

Da mesma forma como ocorreu no primeiro experimento, no segundo experimento os parâmetros para as velocidades espermáticas, integridade de membrana e potencial mitocondrial não apresentaram diferenças ($p > 0,05$), considerando os tratamentos com a presença de antioxidantes em relação ao tratamento sem antioxidantes. Uma hipótese para explicar os resultados obtidos, é que os efeitos do choque térmico e do estresse osmótico foram maiores que os efeitos do estresse oxidativo.

Nos primeiros estudos em peixes, com o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e a dourada (*Sparus auratus*), foram avaliados o ácido ascórbico (1 e 10mM) e α -tocoferol (0,1 e 0,5mM), e não foram observadas diferenças no sêmen pós-descongelamento, para motilidade, velocidade e integridade de membrana (CABRITA et al., 2011). Em curimba (*Prochilodus lineatus*) e em curimatã (*Prochilodus brevis*), diversos autores e avaliaram a inclusão nos diluidores de vitamina E e C em diferentes concentrações e não foram observadas diferenças nos resultados de motilidade, duração e velocidade espermática (PAULA et al., 2012; NAVARRO et al., 2014; ALMEIDA-MONTEIRO, 2017).

Por outro lado, concordando com os resultados do presente estudo, Martínez-Páramo et al. (2012b), com o robalo (*Dicentrarchus labrax*), observaram a melhoria na taxa de motilidade espermática, com a suplementação do diluidores com vitamina E (0,1mM) ou com a vitamina C a (1mM). Ubilla e Valdebenito (2011), em truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*), demonstraram que a adição nos diluentes de vitamina C aumentou as taxas de fecundação.

No segundo experimento, o tratamento com a trealose (100mM) associada as vitaminas C (1mM) e E (0,1mM), apresentou os valores médios mais altos ($p < 0,05$) para a taxa de motilidade e duração da motilidade. Os efeitos individuais da trealose, indicaram a sua importância nas soluções diluidoras. Estudos em várias espécies animais, descreveram os efeitos antioxidantes da trealose, e recomendaram a sua adição nos diluidores de sêmen, com efeitos positivos na qualidade do sêmen pós-descongelamento (TARIQ et al., 2015).

Em peixes, Liu et al. (2015) avaliaram os efeitos da adição de seis antioxidantes em soluções diluidoras para o sêmen do pargo vermelho (*Pagrus major*), e como resultado, a trealose (100mM), a vitamina C (25mM), e a vitamina E (25mM) obtiveram as maiores taxas de motilidades e tempo de latência, quando comparado com ausência dos antioxidantes. No entanto, não foi identificado se o mecanismo de ação da trealose é devido a sua ação nas membranas celulares, ou na proteção das enzimas antioxidantes (LIU et al., 2015; TARIQ et al., 2015).

No presente estudo, nos tratamentos onde a vitamina C estava sozinha ou associada apenas a trealose foram observados os valores mais baixos de duração e motilidade espermática, sendo que a associação dos crioprotetores com os antioxidantes é outro fator que deve ser considerado. Em carpa comum (*Cyprinus carpio*), Linhares et al. (2017) utilizaram as vitaminas C e E ($1\mu\text{g L}^{-1}$) e demonstraram que também existem diferenças na associação entre vitaminas e agentes crioprotetores, onde com o DMSO a vitamina C apresentou duração e motilidade espermáticas superiores a vitamina E, enquanto que para o etilenoglicol a adição das vitaminas apresentou resultados iguais.

A utilização de substâncias antioxidantes nas soluções diluidoras é indicada para a melhoria da qualidade do sêmen pós-descongelamento. Mas, como os efeitos de cada antioxidante são dependentes das espécies, concentrações e crioprotetores utilizados, é essencial a continuidade dos estudos para o melhor entendimento dos mecanismos de ação dos antioxidantes na proteção dos espermatozoides em peixes.

7 CONCLUSÃO

Na criopreservação do sêmen de pintado é recomendado o uso do metanol como agente crioprotetor na concentração de 7,5%, associados à solução diluidora de BTS a 5%.

A adição conjunta dos antioxidantes trealose (100mM), ácido ascórbico (1mM) e α -tocoferol (0,1mM), promoveu a melhoria na qualidade do sêmen criopreservado, aumentando a taxa de motilidade pós-descongelamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, M. S.; DE TOLEDO, C. P.; NEUMANN, G.; BUZZI, A. H.; BURATTO, C. N.; PIANA, P. A.; BOMBARDELLI, R. A. Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 119-28, 2015.

ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; PINHEIRO, R. R. R.; LOPES, J. T.; FERREIRA, Y. M.; MONTENEGRO, A. R.; MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, p. 2669-2680, 2017.

ASTURIANO, J. F., CABRITA, E., HORVATH, A., 2016. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v.245, p.69-76, 2017.

BARZOTTO, E.; OLIVEIRA, M.; MATEUS, L. Reproductive biology of *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz, 1829) and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann and Eigenmann, 1889), two species of fisheries importance in the Cuiabá River Basin, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 33, 29-36, 2017.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 535-548, 2010.

BRITO, M.F.G; BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 624-633, 2003.

BROWNE, R. K.; KAUROVA, S. A.; UTESHEV, V. K.; SHISHOVA, N. V.; MCGINNITY, D.; FIGIEL, C. R.; MANSOUR, N.; AGNEW, D.; WU, M.; GAKHOVA, E. N.; DZYUBA, B.; COSSON, J. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 1-13, 2015.

- CABRITA, E.; MA, S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.; DINIS, M. T. The influence of certain aminoacids and vitamins on frozen-thawed fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1, p. 189-195, 2011.
- CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; GAVAIA, P. J.; RIESCO, M. F.; VALCARCE, D. G.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P.; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389-401, 2014.
- CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; MARIA A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, v. 33, n. 3, p. 285-393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003.
- ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, 74-91, 2017.
- FELIZARDO, V. O.; MELO, C. C. V.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, C. S.; NAVARRO, R. D.; FREITAS, R. T. F. Optimization of artificial propagation in piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*) using criopreserved sêmen. **Cryoletters**, v. 37, n. 5, p. 330-334, 2016.
- GARCIA, R. R. F.; VASCONCELOS, A. C. N.; POVH, J. A.; OBERST, E. R.; VARELA JR., A. S.; CORCINI, C. D.; STREIT JR., D. P. Functional integrity of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 599-606, 2015.
- GARCIA, R. F.; STREIT JR., D. P.; CABRITA, E.; GODOY, L. C. Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges, In: **Cryopreservation in Eukaryotes**. InTech, 2016 p. 57-73.
- JANG, T. H.; PARK, S. C.; YANG, J. H.; KIM, J. Y.; SEOK, J. H.; PARK, U. S.; HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, v. 307, p. 130-140, 2010.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, C. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 314-321, 2010.

LINHARES, F. R. A.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; NUNES, J. F.; CARVALHO M. A. M.; CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Efeito de vitaminas adicionadas ao diluente ACP-104 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 980-988, 2017.

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

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, v. 131, p. 211-218, 2012a.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; HERRÁEZ, M. P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 1129-1136, 2012b.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HORVÁTH, A.; LABBÉ, C.; ZHANG, T.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P.; SUQUET, M.; ADAMS, S.; VIVEIROS, A.; TIERSCH, T. R.; CABRITA, E. Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, v. 472, p. 156-177, 2017.

MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; ANDRADE, E. S.; FERREIRA, M. R.; PAULA, D. A. J.; CARVALHO, A. F. S. Cryopreservation of Sperm in Brazilian Migratory Freshwater Fish, In: Dr. Hideaki Yamashiro (Ed.). **Recent Advances in Cryopreservation**. InTech, 2014. p. 59-71.

NAVARRO, R. D.; NAVARRO, F. K. S. P.; FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, S. S. Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 1, p. 55-60, 2014.

NAVARRO, R. D.; RIBEIRO FILHO, O. P.; FERREIRA, W. M.; PEREIRA, F. K. S. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 33, n. 1, p. 20-25, 2009.

PAULA, D. A. J.; ANDRADE, E. S.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; WINKALER, E. U.; ZEVIANI, W.; FREITAS, R. T. F. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 661-665, 2012.

PINHEIRO, J. P.S.; MELO-MACIEL, M. A. P.; LINHARES, F. R. A., LOPES, J. T.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; PINHEIRO, R. R. R.; TORRES, T.M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Use of glucose or BTS combined with DMSO or methylglycol under two different freezing protocols for the cryopreservation of sperm from the common curimatã (*Prochilodus brevis*). **Animal Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 779-786, 2016.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5, n.1, p.1-9, 2017.

SARASWAT, S.; JINDAL, S. K.; KHARCHE, S. D. Antioxidant and spermatozoa a complex story. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 86, n. 5, p. 495-501, 2016.

SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A.; GAZO, I.; COSSON, J.; LINHART, O. Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, p. 313-320, 2013.

TARIQ, M.; KHAN, M. S.; SHAH, M. G.; NISHA, A. R.; UMER, M.; HASAN, S. M.; RAHMAN, A.; RABBANI, I. Exogenous antioxidants inclusion during semen cryopreservation of farm animals. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 2273-2280, 2015.

UBILLA, A.; VALDEBENITO, I. Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability. **Latim American Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 1, p. 338-343, 2011.

VARELA JUNIOR. A. S.; GOULARTE, K. L.; ALVES, J. P.; PEREIRA, F. A.; SILVA, E. F.; CARDOSO, T. F.; JARDIM, R. D.; STREIT JR, D. P.; CORCINI C. D. Methods of cryopreservation of tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 71-77, 2015.

VELARDE, J. M. C. **Avaliação das características seminais e criopreservação do sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriforme Pimelodidae)**. 2013. 75 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências de São José do Rio Preto, 2013.

VIVEIROS, A. T. M. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: TIERSCH, T. R., GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in Aquatic Species**. 2nd. ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2011. p. 387-397.

VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; LEAL, M. C.; GONÇALVES, A. C.; ÓRFÃO, L. H.; COSSON, J. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 193-201, 2015.

YABU, M. H. S.; VIDOTTO-MAGNONI, A. P.; CASIMIRO, A. C. R.; GARCIA, D. A. Z.; COSTA, A. D. A.; PRADO, F. D. D.; PORTO-FORESTI, F.; ORSI, M. L. First record of non-native hybrid catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus* in the Upper Paraná River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 92, n. 1, p. 261-267, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotecnologia de criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante para o melhoramento genético e para a conservação de espécies de peixes de interesse econômico e ambiental. No entanto existem poucas informações sobre o desenvolvimento de protocolos específicos para o congelamento do sêmen tanto para o pintado como para o jundiá amazônico.

Foram estudadas diferentes alternativas para o congelamento do sêmen nas duas espécies, buscando a melhoria da qualidade pós-descongelamento. Entre as abordagens realizadas, a avaliação de diferentes agentes crioprotetores teve como resultado a recomendação do uso do crioprotetor metanol a 7,5%, associado à solução de BTS a 5% para o sêmen de pintado. Os crioprotetores metanol a 10% ou DMSO a 10%, associados à solução de glicose a 5% apresentaram resultados positivos, mas não foram satisfatórios para estabelecer uma recomendação para o sêmen de jundiá amazônico.

A utilização de antioxidantes promoveu efeitos positivos sobre a motilidade e duração espermática no sêmen criopreservado de pintado, quando associados à solução de BTS com metanol a 7,5%. Assim, a adição conjunta dos antioxidantes trealose (100mM), ácido ascórbico (1mM) e α -tocoferol (0,1mM) nas soluções diluidoras é recomendado para promover a melhoria na qualidade do sêmen pós-descongelamento.

A avaliação da qualidade do sêmen criopreservado em conjunto com a padronização das soluções diluidoras são essenciais para a definição dos protocolos de congelamento nas duas espécies. Assim, a continuidade dos estudos com foco em soluções diluidoras mais eficientes deve ser estimulada, possibilitando a aplicação comercial da tecnologia no desenvolvimento da cadeia produtiva da aquicultura.