



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

MARCOS LUIZ DA SILVA APOLIANO

ADIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA MARINHA
***Ascophyllum nodosum* AO MEIO DILUIDOR NO RESFRIAMENTO SEMINAL DE**
TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816)

FORTALEZA

2024

MARCOS LUIZ DA SILVA APOLIANO

ADIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA MARINHA
Ascophyllum nodosum AO MEIO DILUIDOR NO RESFRIAMENTO SEMINAL DE
TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Aquicultura.

Orientador(a): Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley.

Coorientador(a): Profa. Dra. Larissa Teixeira Nunes.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A654a Apoliano, Marcos Luiz da Silva.

Adição de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* ao meio diluidor no resfriamento seminal de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) / Marcos Luiz da Silva Apoliano. – 2024.

72 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley .

Coorientação: Profa. Dra. Larissa Teixeira Nunes.

1. Conservação Seminal. 2. Agente Antioxidante. 3. Tambaqui. I. Título.

CDD 639.2

MARCOS LUIZ DA SILVA APOLIANO

ADIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA MARINHA
Ascophyllum nodosum AO MEIO DILUIDOR NO RESFRIAMENTO SEMINAL DE
TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Aquicultura.

Aprovada em: 15 / 02 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Anna Clara Accioly Ferreira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. José William Alves da Silva
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

A Deus

À minha mãe Vanda e avó Maria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade, por me conceder a vida, saúde, força e coragem para conquistar meus sonhos e objetivos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de estudo de Doutorado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley, pela confiança em mim depositada e pela excepcional orientação. Agradeço também, pelo acolhimento, motivações e complacência durante a realização de meu doutorado.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Larissa Teixeira Nunes, pelas relevantes contribuições na elaboração e realização do presente trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, Profa. Dra. Anna Clara Accioly Ferreira e Prof. Dr. José William Alves da Silva, pelas valiosas colaborações e sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica Marinha (DEP/UFC), em especial à Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo e Dr. José Ariévilo Gurgel Rodrigues, pela parceria e colaboração para a extração dos polímeros que foram objeto de estudo no presente trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca, pelo conhecimento compartilhado durante minha formação profissional, em especial ao Prof. Dr. Aldeney Andrade Soares Filho, que tanto contribuiu durante minha vida acadêmica.

À minha mãe Vanda Batista, por todo esforço, apoio e amor incondicional dedicados durante todas as fases de minha vida. Da mesma forma, agradeço à minha avó Maria da Cruz, pelo zelo, amor e carinho investidos a mim.

À minha esposa Aurení Paiva, pelo apoio, paciência e por partilhar, com amor, dos momentos valiosos do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), pelo companheirismo, acolhimento e ajuda em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também, pelas motivações, paciência e por tornar mais amenas as adversidades da pós-graduação.

Ao colaborador e amigo, Senhor César, que tanto me ajudou e motivou durante a montagem dos meus experimentos e ao longo das demais atividades práticas cotidianas.

“Deus é o nosso refúgio e a nossa fortaleza,
auxílio sempre presente na adversidade.”
(SALMOS 46:1).

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe neotropical oriundo da bacia do Rio Amazonas com elevado potencial aquícola, sendo a espécie de peixe nativo mais produzida no Brasil. Nesse cenário, são necessárias pesquisas e novas tecnologias que impulsionem o crescimento produtivo da espécie, sobretudo aquelas relacionadas ao seu processo reprodutivo. Dentre os avanços biotecnológicos alusivos à reprodução do tambaqui, destaca-se a técnica de resfriamento seminal. Contudo, esse processo contribui para o estresse oxidativo e dano celular gamético. Como alternativa é proposto a adição de compostos antioxidantes ao meio diluidor, tais quais, os polissacarídeos sulfatados (PS). Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito do uso de diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* sobre os parâmetros de qualidade espermática do sêmen resfriado de tambaqui. Para isso, foram utilizados dois tratamentos controle: T1 (sêmen *in natura*) e T2 (sêmen + água de coco em pó, ACP[®]-104); e três grupos experimentais: T3 (sêmen + ACP[®]-104 + 0,25 mg.mL⁻¹ de PS), T4 (sêmen + ACP[®]-104 + 0,50 mg.mL⁻¹ de PS) e T5 (sêmen + ACP[®]-104 + 0,75 mg.mL⁻¹ de PS). As amostras foram submetidas ao resfriamento e mantidas nessa condição durante 6, 12, 24, 48 e 72 horas, à temperatura de 4 °C. Durante cada período, as amostras foram analisadas quanto à motilidade total, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP), morfologia, integridade da membrana e do DNA espermático. Após 24 horas, para o tratamento *in natura*, observou-se uma brusca queda nos valores de todos os parâmetros espermáticos estudados. Enquanto que o tratamento T2, proporcionou melhores médias de motilidade total (44,8 ± 10,7%), VCL (55,8 ± 18,7%), VSL (44,4 ± 15,5%), VAP (52,1 ± 12,7%) e integridade de DNA (19,68 ± 1,44%), do que os tratamentos suplementados com PS. Entretanto, não houve diferenças para os resultados de integridade de membrana e morfologia espermática. Não houve diferença entre as taxas de fertilização para os tratamentos T2 e T5 após 24 horas de resfriamento se comparado ao sêmen fresco. Os resultados sugerem que suplementação com PS da macroalga marinha *A. nodosum* não é capaz de manter a qualidade de todos os parâmetros espermáticos do sêmen de tambaqui armazenado por diferentes tempos à 4 °C. Contudo, não apresenta efeitos negativos sobre a integridade da membrana e na morfologia dos espermatozoides da espécie. Além disso, é possível concluir que a adição de 0,75 mg.mL⁻¹ de PS promove melhorias sobre a taxa de fertilização em até 24 horas de resfriamento seminal de tambaqui, sendo portanto, recomendado sua adição para manutenção da capacidade fecundante dos espermatozoides da espécie.

Palavras-chave: conservação seminal; agente antioxidante; tambaqui.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a neotropical fish from the Amazon River basin with high aquaculture potential, being the most produced native fish species in Brazil. In this scenario, research and new technologies are needed to boost the productive growth of the species, especially those related to its reproductive process. Among the biotechnological advances related to the reproduction of this species, the seminal cooling technique stands out. However, this process contributes to oxidative stress and gametic cell damage. As an alternative, it is proposed to add antioxidant compounds to the diluting medium, such as sulfated polysaccharides (PS). Therefore, this work aims to evaluate the effect of using different concentrations of sulfated polysaccharides from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum* on the sperm quality parameters of cooled tambaqui semen. For this, two control treatments were used: T1 (fresh semen) and T2 (semen + powdered coconut water, ACP[®]-104); and three experimental groups: T3 (semen + ACP[®]-104 + 0.25 mg.mL⁻¹ of PS), T4 (semen + ACP[®]-104 + 0.50 mg.mL⁻¹ of PS) and T5 (semen + ACP[®]-104 + 0.75 mg.mL⁻¹ PS). The samples were subjected to cooling and maintained in this condition for 6, 12, 24, 48 and 72 hours, at a temperature of 4 °C. During each period, samples were analyzed for total motility, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average speed of the route (VAP), morphology, membrane integrity and sperm DNA. After 24 hours, for the in natura treatment, a sudden drop in the values of all sperm parameters studied was observed. While the T2 treatment provided better means of total motility ($44.8 \pm 10.7\%$), VCL ($55.8 \pm 18.7\%$), VSL ($44.4 \pm 15.5\%$), VAP ($52.1 \pm 12.7\%$) and DNA integrity ($19.68 \pm 1.44\%$) than treatments supplemented with PS. However, there were no differences in the results of membrane integrity and sperm morphology. There was no difference between fertilization rates for T2 and T5 treatments after 24 hours of cooling compared to fresh semen. The results suggest that supplementation with PS from the marine macroalga *A. nodosum* is not capable of maintaining the quality of all sperm parameters of tambaqui semen stored for different times at 4 °C. Furthermore, it is possible to conclude that the addition of 0.75 mg.mL⁻¹ of PS promotes improvements in the fertilization rate within 24 hours of tambaqui seminal cooling, therefore, its addition is recommended to maintain the fertilizing capacity of sperm of the species.

Keywords: seminal conservation; antioxidant agent; tambaqui.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplar de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	14
Figura 2 – Exemplar da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i>	25
Figura 3 – Estrutura molecular do fucoidan extraído de <i>Ascophyllum nodosum</i>	25
Figura 4 – Tanque de alvenaria onde os animais experimentais permaneceram estocados	30
Figura 5 – Motilidade total (%) dos espermatozoides de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i> ($n = 8$ pools)	36
Figura 6 – Integridade do DNA (%) dos espermatozoides de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i> ($n = 8$ pools)	43
Figura 7 – Morfologia (%) dos espermatozoides de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i> ($n = 8$ pools)	46
Figura 8 – Integridade de membrana plasmática (%) dos espermatozoides de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i> ($n = 8$ pools)	48
Figura 9 – Aspectos de gametas masculinos e femininos de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) utilizados durante a fertilização. (A) Sêmen de três indivíduos utilizados para formação do <i>pool</i> 100% fresco. (B) Ovócitos de fêmea utilizada durante a fertilização	51
Figura 10 – Fases do desenvolvimento embrionário de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental	31
Tabela 2 – Velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e velocidade média do percurso (VAP; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) do sêmen de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) resfriado em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i> ($n = 8$ pools)	40
Tabela 3 – Taxa de fertilização com sêmen de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) resfriado em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha <i>Ascophyllum nodosum</i> , em 24 horas de armazenamento à 4 °C ($n = 3$)	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP [®] -104	Água de Coco em Pó
ANOVA	Análise de Variância
CASA	Sistema de Análise Seminal Auxiliado por Computador
CEBIAQUA	Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura
CEUA	Comitê de Ética para Uso Animal
CV	Cavalo-Vapor
DEP	Departamento de Engenharia de Pesca
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPC	Extrato Pituitário de Carpa
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LBM	Laboratório de Bioquímica Marinha
LBRP	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PS	Polissacarídeos Sulfatados
RNA	Ácido Ribonucleico
SCA	Sperm Class Analyzer
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAP	Velocidade Média do Percurso (average trajectory velocity)
VCL	Velocidade Curvilínea (curvilinear velocity)
VSL	Velocidade em Linha Reta (straight line velocity)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	<i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1816)	15
3.2	Biologia reprodutiva	16
3.3	Resfriamento seminal	18
3.4	Estresse oxidativo	21
3.5	Compostos antioxidantes	22
3.5.1	<i>Polissacarídeos Sulfatados</i>	24
3.5.2	<i>Ascophyllum nodosum</i> (Linnaeus) Le Jolis 1863	25
4	JUSTIFICATIVA	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1	Local do trabalho	30
5.2	Extração de Polissacarídeos Sulfatados	30
5.3	Animais experimentais e coleta seminal	31
5.4	Diluição Seminal e Desenho Experimental	32
5.5	Análises espermáticas	33
5.6	Taxa de Fertilização	35
5.7	Análises estatísticas	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*; CUVIER, 1816) é um peixe neotropical da família *Serrasalminidae*, nativo da bacia do Rio Amazonas (CALCAGNOTTO; SCHAEFER; SALLE, 2005). Essa espécie é considerada de grande importância para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil, sendo o peixe nativo mais produzido comercialmente no país, com 109,8 mil toneladas, correspondendo a 17,8% da produção total de pescados produzidos em 2022 (IBGE, 2023). Seu cultivo é impulsionado pelo elevado potencial de crescimento corporal, elevada produtividade, relativa resistência a doenças, tolerância a altas temperaturas e a moderadas concentrações de oxigênio dissolvido na água de cultivo (LIMA *et al.*, 2019; SAINT-PAUL, 2017). O *C. macropomum* é um peixe reofílico de desova total. Sua reprodução em confinamento é realizada por meio da fertilização artificial, com o uso da indução hormonal para a ovulação, espermiacção e desova (SOUZA *et al.*, 2018; ZOHAR; MYLONAS, 2001). Avanços biotecnológicos vêm sendo observados quanto aos aspectos reprodutivos dessa espécie, dentre eles, destaca-se a criopreservação de gametas.

O resfriamento do sêmen é o método de criopreservação mais barato, simples e menos estressante, pois atua em maiores temperaturas de armazenamento, em torno de 4°C (DILAURO *et al.*, 1994; PIRES *et al.*, 2019). O armazenamento hipotérmico de sêmen permite sua viabilidade por algumas horas ou dias (CARNEIRO *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2016). Tal fato possibilita otimizar o uso dos espermatozoides de bons reprodutores, empregando-os em tempos e locais diferentes, bem como no momento mais adequado para a realização da fertilização. Essa técnica facilita o intercâmbio entre instituições de pesquisa e pisciculturas, diminui os riscos de endocruzamento e elimina a necessidade de transporte de reprodutores (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2009).

Apesar de todos esses benefícios, durante a aplicação do resfriamento, os gametas são submetidos à redução da temperatura, o que pode contribuir para o estresse oxidativo. A aplicação do frio pode representar um evento de estresse sobre as células, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essa produção desordenada de EROs propicia a diminuição da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (CABRITA *et al.*, 2014; FIGUEROA *et al.*, 2018; SANDOVAL-VARGAS *et al.* 2021).

A adição de compostos com potencial efeito antioxidante ao meio crioprotetor espermático, a fim de reduzir o estresse oxidativo causado por EROs, é uma abordagem recente e já testada em diversas espécies de peixes e com diferentes agentes antioxidantes (CABRITA *et al.*, 2011; FÉLIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; FIGUEROA *et al.*, 2018; KUTLUYER *et*

al., 2014; LÍ *et al.*, 2018; MOTTA *et al.*, 2022). Dentre estes, estão inclusos os polissacarídeos sulfatados (PS).

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros complexos formados por açúcares carregados negativamente pela presença de radicais de sulfatos. Estes radicais doam elétrons e exercem poder redutor, além de favorecer sua ligação às proteínas em solução no organismo (ANAND *et al.*, 2016; JRIDI *et al.*, 2019). Essa especificidade estrutural pode ser responsável pelas inúmeras atividades biológicas vinculadas a essas moléculas bioativas, dentre elas, a atividade antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2020). Os PS competem com os íons superóxidos e possuem capacidade de quelar íons ferrosos livres, contribuindo com a capacidade antioxidante (ALBERTINI *et al.*, 2000; CAMPO *et al.*, 2006; QI *et al.*, 2005).

Poucos trabalhos foram realizados com o uso do resfriamento seminal para o tambaqui, entre eles, já foram testadas diferentes soluções diluidoras (GARCIA *et al.*, 2016), adição de crioprotetores ao meio diluente (DE OLIVEIRA, 2022) e verificados os efeitos do resfriamento na qualidade espermática (PIRES *et al.*, 2019). Contudo, são inexistentes trabalhos que averiguem a fertilização com sêmen de tambaqui resfriado com adição de polissacarídeos sulfatados ao meio diluidor.

Dessa forma, ainda há a necessidade de aprimorar os protocolos já existentes para o armazenamento seminal à curto prazo, a fim de melhorar a qualidade espermática do sêmen pós-resfriado de *C. macropomum* e, conseqüentemente, obter melhores taxas de fertilização da espécie. Tornando assim, o processo reprodutivo mais eficiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* no meio de resfriamento seminal de *Collossoma macropomum*, sobre a qualidade espermática, durante diferentes tempos de armazenamento à 4 °C.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos da suplementação do meio de resfriamento seminal de *C. macropomum* com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados, sobre os parâmetros de cinética, morfologia, integridade da membrana plasmática e integridade do DNA espermático.
- Averiguar qual a concentração de polissacarídeos sulfatados é ideal para suplementar o meio de resfriamento seminal de *C. macropomum*.
- Identificar o período ideal de armazenamento à 4 °C, que a suplementação com as diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados é capaz de manter a viabilidade espermática de *C. macropomum*.
- Analisar a capacidade fecundante dos espermatozoides de tambaqui após resfriamento seminal em meio suplementado com diferentes concentrações de PS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816)

O *Colossoma macropomum* (Figura 1), conhecido popularmente como tambaqui é uma espécie de peixe teleósteo Neotropical amplamente distribuída na América do Sul. Dentre suas principais características morfológicas, destaca-se o formato do corpo arredondado, a presença de um dorso alto e região das costelas amplas, tornando-se mais alongado e levemente comprimido lateralmente na fase adulta (RODRIGUES *et al.*, 2013). Considerado de grande porte, o tambaqui pode chegar a 1,0 m de comprimento e pesar até 30 kg (MORAIS; O'SULLIVAN, 2017). Apresenta nadadeira adiposa raiada, sem a presença de espinho pré-dorsal e sua linha lateral é formada por 67 a 76 escamas (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998). Sua coloração pode variar em função da cor da água e, juvenis e adultos apresentam uma mancha escura na região mediana do corpo, ao nível de sua linha lateral. O tambaqui possui dentes molariformes e fortes mandíbulas que facilitam sua alimentação com frutos e sementes, além disso possui rastros branquiais longos e desenvolvidos, com a capacidade de filtrar o fito e zooplâncton presente na água (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998; MORAIS; O'SULLIVAN, 2017; SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2009).

Figura 1 – Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*).



Fonte: <https://www.aquaculturebrasil.com>

Embora seja nativo da bacia do Amazonas e Orinoco, o tambaqui é encontrado geograficamente na Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (VAL; OLIVEIRA, 2021), sendo também, uma das principais espécies produzidas na aquicultura sul-americana e em vários países asiáticos, como China, Indonésia, Malásia, Mianmar e Vietnã (WOYNÁROVICH; VAN-ANROOY, 2019). No Brasil, essa espécie é considerada de grande importância para o

desenvolvimento da aquicultura nacional, sendo o peixe nativo mais produzido comercialmente no país (IBGE, 2023).

Em 2022, a produção brasileira de tambaqui foi de 109,8 mil toneladas, correspondendo a 17,8% da produção total de pescado do país, com destaque para a Região Norte, que representa 76,7% de toda a produção brasileira da espécie. De acordo com dados do IBGE (2023), dentre os principais Estados produtores de tambaqui, destaca-se a Rondônia com 36,7% do volume total da produção nacional, seguido pelos Estados do Maranhão e Roraima, ambos com 12,1%, Amazonas (7,3%) e Tocantins (7,2%).

O cultivo de *C. macropomum* é impulsionado por diversas características zootécnicas, fisiológicas e comportamentais que favorecem seu uso como espécie economicamente viável à produção. Dentre elas, destacam-se seu elevado potencial de crescimento, podendo atingir até 30,0 kg de peso corporal e um metro de comprimento (HILSDORF *et al.*, 2022); tolerância a moderadas concentrações de oxigênio dissolvido na água devido ao processo de respiração superficial aquática e expansão reversível dos lábios inferiores, chamado de prolapso labial (VAL; OLIVEIRA, 2021); relativa tolerância às altas temperaturas e variações de pH proporcionada por adaptações fisiológicas e bioquímicas, que reduzem os efeitos do estresse causado (OLIVEIRA; VAL, 2017); e fácil adaptação às condições de cultivo e à alimentação com rações formuladas (HILSDORF *et al.*, 2022).

Além da importância para o setor aquícola, o tambaqui também exerce importância ecológica pela dispersão de sementes ao longo das florestas alagadas da bacia amazônica. Além disso, exerce um importante papel social para as comunidades pesqueiras, tendo seu consumo relacionado à pesca de subsistência, muito embora, também tenha papel fundamental para o comércio local da região amazônica (HILSDORF *et al.*, 2022).

3.2 Biologia reprodutiva

O tambaqui é uma espécie reofílica e realiza longas migrações durante seu período reprodutivo, que segundo Villacorta-Correa e Saint-Paul (1999) ocorre durante os meses de novembro a fevereiro, coincidindo com o período de cheia dos rios. Durante esse período, os adultos saem de várzeas, córregos e lagos, que são considerados habitats de alimentação, em direção às áreas de reprodução e desova, localizadas ao longo das margens dos principais canais dos rios, entre as raízes de macrófitas aquáticas (HILSDORF *et al.*, 2022; VAL; OLIVEIRA, 2021).

O processo de migração é mediado por fatores fisiológicos (hormonais), ambientais (temperatura, fotoperíodo e pluviosidade) e sociais (presença do sexo oposto) (VIEIRA; ISAAC; FABRE, 1999). Em cativeiro, a migração, também conhecida como piracema, é impedida de acontecer, ocasionando a supressão dos processos fisiológicos que atuam na reprodução. Tal fato impede a liberação natural dos ovócitos, sendo imprescindível o uso de hormônios indutores da desova, como: o extrato pituitário de carpa (EPC) e os análogos de hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRHs). Estes hormônios agem diretamente na meiose e promovem a maturação gonadal final, bem como a liberação dos gametas (HARVEY; CAROLSFELD, 1993; SOUZA *et al.*, 2018).

O tratamento convencional de indução hormonal do tambaqui com EPC é economicamente oneroso e, por vezes, ineficaz para a indução da reprodução de todas as fêmeas (KONZEN-FREITAS *et al.*, 2020). Como alternativa ao EPC, Souza *et al.*, (2018) obtiveram sucesso na reprodução de fêmeas de tambaqui com a utilização do indutor Ovopel[®] (análogo de GnRH de mamífero [D-Ala⁶, Pro⁹Net-mGnRH] combinado com um antagonista da dopamina [metoclopramida]). Neste estudo, foi obtida uma taxa de desova de 100% com a aplicação de 0,2 pélete.kg⁻¹ do peso corporal. Esses resultados indicam que uma única dose do produto (Ovopel[®]) é eficaz para indução da desova em fêmeas da espécie.

O tambaqui é um peixe de desenvolvimento ovariano sincrônico, de fecundação externa, de elevada fertilidade, com desova em grupo e sem cuidado parental. As larvas são transportadas pelas correntes de água durante quatro a 15 dias, percorrendo longas distâncias à deriva para lagos de várzea, onde as pós-larvas passam para a fase de juvenil. Machos e fêmeas da espécie atingem maturidade sexual com 3 e 4 anos, respectivamente, com peso total de 3-6 kg. No entanto, apresentam melhor desempenho reprodutivo entre 4-7 anos, com peso corporal de 4-7 kg (HILSDORF *et al.*, 2022; VAL; OLIVEIRA, 2021).

A crescente demanda por pescado de qualidade e o acelerado desenvolvimento aquícola impulsionam o interesse pela otimização de biotecnologias para produção de peixes nativos, em especial aquelas relacionadas à reprodução. Ainda assim, grande parte dessa produção é baseada em populações não selecionadas, o que pode causar problemas como a redução da variabilidade genética e aumento da endogamia (FREITAS *et al.*, 2021; MASTROCHIRICO-FILHO *et al.*, 2019). Dessa forma, a aplicação de técnicas de conservação seminal é uma importante ferramenta para a propagação artificial de espécies de peixes nativos, tal qual, o tambaqui.

3.3 Resfriamento seminal

O resfriamento seminal é uma tecnologia de conservação de gametas que promove o armazenamento de espermatozoides à curto prazo. Essa técnica consiste na estocagem de amostras seminais, na ausência de luz, a temperaturas entre 0 e 4 °C e em atmosfera de oxigênio por horas ou dias (CONTRERAS *et al.*, 2020; SHALIUTINA *et al.*, 2013). Além disso, consiste em um método eficiente, simples, de menor custo e menor impacto deletério aos espermatozoides, pois atua em maiores temperaturas de armazenamento e dentro da faixa tolerável aos efeitos do frio (CONTRERAS *et al.*, 2020; DILAURO *et al.*, 1994; PIRES *et al.*, 2019).

Para a aquicultura, a conservação seminal a curto prazo é uma ferramenta destinada ao aperfeiçoamento das estratégias reprodutivas, visando a manutenção da viabilidade espermática e a preservação da sua capacidade de fertilização (CONTRERAS *et al.*, 2020). Dentre as principais vantagens da utilização da conservação seminal, vale destacar: a provisão controlada e contínua de gametas, possibilitando seu uso no momento mais adequado da reprodução e solucionando o problema da assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas; a eliminação da necessidade de manter ou transportar reprodutores permanentes para fertilização artificial; a realização de estudos sobre a conservação do patrimônio genético desejável aos programas de hibridização e seleção genética; e a facilidade do intercâmbio entre instituições de pesquisas e pisciculturas (CONTRERAS *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2019; SHAZADA *et al.*, 2023).

No entanto, existem alguns fatores que podem afetar a qualidade e viabilidade dos espermatozoides submetidos ao armazenamento hipotérmico, são eles: temperatura de armazenamento, exposição a luz, atmosfera circundante, uso de antibióticos e diluentes. (CONTRERAS *et al.*, 2020; SHAZADA *et al.*, 2023).

A temperatura utilizada durante o resfriamento seminal interfere decisivamente no sucesso do armazenamento a curto prazo. Fatores como a tolerância do sêmen ao frio nas espécies aquáticas, a redução do metabolismo espermático e do crescimento bacteriano, influenciam sobre a faixa ideal para conservação gamética em peixes (CONTRERAS *et al.*, 2020; SHAZADA *et al.*, 2023). Nesse sentido, Ravinder *et al.* (1997) observaram que espermatozoides não diluídos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) apresentaram perda total de seu potencial cinético dentro de 20 e 84 horas após resfriamento à 22 e 2 °C, respectivamente. Enquanto que, ao serem armazenados à 5 °C, obtiveram-se uma motilidade espermática de 33% em até 84 horas de resfriamento. Ao avaliarem o resfriamento do sêmen não diluído de truta

arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Scott e Baynes (1980) verificaram a manutenção da capacidade fecundante dos espermatozoides por menos de 24 horas quando armazenado à 12 °C, enquanto que, quando armazenado entre 0 e 5 °C foi observado uma capacidade de fertilização espermática por até oito dias.

De forma geral, durante o resfriamento seminal é recomendado que haja uma boa troca gasosa entre o sêmen e a atmosfera circundante, de tal forma a prevenir os efeitos nocivos causados pela anoxia. Com isso, aconselha-se armazenar a amostra seminal em recipientes com área livre de 2 a 4 mm de altura, para que haja uma melhor interação entre a interface atmosfera/sêmen. Alguns autores já demonstraram a necessidade da adição de oxigênio ao meio diluente durante o resfriamento seminal para esturjão do Atlântico, *A. oxyrinchus*, (BILLARD *et al.*, 2004) e robalo, *Morone saxatilis* (JENKINS-KEERAN *et al.*, 2001). Billard *et al.* (2004) sugerem que a necessidade de oxigênio pode estar associada aos estoques de ATP, que se esgotam em condições anoxias e resultam na perda de motilidade total. Por outro lado, estudos realizados com seis espécies de peixes de água doce brasileiros não verificaram diferenças entre os espermatozoides mantidos ou não sob refrigeração rica em oxigênio (MARQUES; GODINHO, 2004).

Durante o armazenamento seminal a curto prazo, a presença de bactérias no sêmen tem sido apontada como um dos principais fatores que afetam a viabilidade, cinética espermática e a capacidade de fertilização dos espermatozoides em peixes (VIVEIROS *et al.*, 2010). Com isso, a adição de antibióticos a solução diluidora é uma importante ferramenta para o sucesso do resfriamento seminal, apresentando bons resultados para diversas espécies, tais como para a carpa comum, *Cyprinus carpio* (SAAD *et al.*, 1988), bacalhau do atlântico, *Gadus morhua* (DEGRAAF; BERLINSKY, 2004) e piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VIVEIROS *et al.*, 2010). Ao testarem o uso de gentamicina para o controle do crescimento bacteriano durante o resfriamento seminal de piracanjuba, Viveiros *et al.*, (2010) verificaram que a adição de 0,1 mg.mL⁻¹ do antibiótico proporcionou maior motilidade espermática e inibiu o desenvolvimento bacteriano em até seis dias de armazenamento à 4-6 °C, sem prejuízos à fertilização.

Os meios diluentes possuem objetivo de prolongar o tempo de armazenamento e proteger os espermatozoides da ação tóxica dos subprodutos do metabolismo celular e do choque térmico promovido pela variação brusca de temperatura. Além disso, atuam na prevenção da oxidação das membranas plasmática e mitocondrial, fornecendo substrato energético e isosmolaridade ao meio extracelular (ULLOA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018). Para isso o sêmen de peixes é diluído em soluções salinas isotônicas ou diluentes que apresentam

composição química semelhante ao plasma seminal específico de cada espécie (BOBE; LABBÉ, 2009).

Dentro dos testículos, os espermatozoides dos peixes apresentam-se imóveis e essa característica deve ser mantida durante a diluição e resfriamento para evitar o rápido esgotamento das reservas energéticas das células espermáticas. Dentre os principais benefícios dos diluentes, destacam-se a redução da densidade espermática, que facilita a absorção de oxigênio e trocas gasosas; prevenção da ativação flagelar e o rápido esgotamento das reservas energéticas; fornecimento de compostos orgânicos para o metabolismo energético; redução da desidratação celular (BOBE; LABBÉ, 2009; CONTRERAS *et al.*, 2020; TRIGO *et al.*, 2015). Ao avaliarem a adição de uma solução diluidora durante o resfriamento seminal de esturjão do Atlântico (*Acipenser oxyrinchus*), Park e Chapman (2005) observaram que o sêmen diluído manteve a motilidade espermática por até 21-28 dias resfriado à 4 °C, enquanto que o sêmen não diluído armazenado nas mesmas condições manteve sua capacidade de fertilização por apenas 12-36 horas.

Ao testarem água de coco em pó (ACP[®]-104) e Glicose como meios diluentes durante o resfriamento seminal de tambaqui à 4 °C, De Oliveira *et al.* (2022) obtiveram melhores resultados com o uso de ACP[®]-104. Sendo este, portanto, o diluente mais indicado para o armazenamento a curto prazo da espécie, em até 72 horas. A água de coco em pó (ACP) já foi amplamente testada como diluente na conservação seminal de mamíferos (NUNES; SALGUEIRO, 1999; SILVA *et al.*, 2011; ZORZETTO *et al.*, 2018), aves (RONDON *et al.*, 2008) e peixes (DE ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2020; DO NASCIMENTO *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; NUNES *et al.*, 2016), apresentando resultados satisfatórios para esta utilização. Seus efeitos benéficos são justificados devido à sua rica composição em sais minerais, proteínas, aminoácidos, carboidratos (frutose e glicose), vitaminas (B1, B2, B3, B6 e C), fatores de crescimento (fito-hormônios), antioxidantes e uma pequena quantidade de fosfolípidios e ácidos graxos, que juntos, constituem um meio nutritivo e favorável à sobrevivência dos espermatozoides (AROUCHA; VIANNI, 2002; CARVALHO *et al.*, 2014).

Além dos fatores citados acima, o processo de conservação seminal pela aplicação do frio aumenta a produção de EROs e, devido a diluição do plasma seminal, contribui para o desequilíbrio do sistema antioxidante natural e ocorrência do estresse oxidativo. Além disso, as membranas plasmáticas dos espermatozoides são constituídas por ácidos graxos, que são bastante instáveis e susceptíveis aos ataques das espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica (WATHES *et al.*, 2007).

3.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo inevitável no metabolismo aeróbico. A molécula de oxigênio (O_2) é fundamental para manutenção das funções celulares aeróbicas. No entanto, a exposição celular a esse elemento pode desencadear reações indesejáveis ao metabolismo, pela geração em excesso de moléculas parcialmente reduzidas, também conhecidas por espécies reativas de oxigênio - EROs (CABRITA *et al.*, 2014; SANDOVAL-VARGAS *et al.* 2021).

As EROs são agentes pró-oxidantes derivados do oxigênio e desempenham funções importantes sobre as vias celulares reguladas por processos redox (SANDOVAL-VARGAS *et al.* 2021). Para mamíferos em metabolismo fisiológico normal, pequenas quantidades de EROs modulam os processos fisiológicos associadas à capacitação e regulação da motilidade espermática (AITKEN, 2017; ZILLI, SCHIAVONE; VILELLA, 2017). Morita *et al.* (2011) observaram que a presença da enzima Cu/Zn-superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), na cabeça e flagelo dos espermatozoides de *Oreochromis mossambicus*, está associada à regulação dos processos de fosforilação das proteínas espermáticas e da nitração dos resíduos de tirosina nas proteínas flagelares. Ambos estão correlacionados com a ativação da atividade flagelar. Isso sugere que a atividade flagelar para peixes também é regulada por mecanismos dependentes das EROs, porém há a necessidade de estudos que elucidem a ação desses processos bioquímicos para estes organismos (AITKEN; DREVET, 2020; ZILLI; SANDOVAL-VARGAS *et al.* 2021; SCHIAVONE; VILELLA, 2017).

Apesar de sua essencialidade para alguns processos fisiológicos, o excesso de EROs pode interagir facilmente com proteínas, lipídios, DNA, RNA e promover injúrias celulares nos mais diversos níveis, que aliadas ao desequilíbrio entre os agentes antioxidantes presentes na célula, induzem ao chamado estresse oxidativo (CABRITA *et al.*, 2014). As EROs são produzidas como subproduto da cadeia respiratória mitocondrial ou de sistemas enzimáticos intracelulares (BAKER; AITKEN, 2004). Dentre as principais EROs podemos citar os radicais ânion superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peroxila (ROO^-), óxido nítrico (NO^-) e as moléculas peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (1O_2), ácido hipocloroso (HClO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (SANDOVAL-VARGAS *et al.* 2021).

As células espermáticas são altamente suscetíveis à ação das EROs e ao estresse oxidativo. A membrana plasmática dos espermatozoides possui um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados em sua composição, o que a torna vulnerável ao ataque oxidativo das EROs e peroxidação lipídica. Além disso, a ação das EROs pode resultar em uma série de alterações patológicas aos espermatozoides, tais como a oxidação proteica, prejuízos à peça

intermediária e no axonema, deficiências mitocondriais e fragmentação do DNA. Tais alterações podem contribuir para a redução da viabilidade espermática e a capacidade de fertilização do sêmen (AITKEN, 2020; CABRITA *et al.*, 2014; DA COSTA; STREIT JR., 2019; FELIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; WATHES *et al.*, 2007).

Para peixes, o plasma seminal fornece a principal defesa contra o estresse oxidativo e ação das EROs sobre as células espermáticas, uma vez que, durante o processo de espermatogênese, os espermatozoides perdem uma significativa parte dos seus antioxidantes endógenos e passam a depender dos antioxidantes presentes no plasma (GAUTIER; AURICH, 2022). Segundo Aitken e Drevet (2020), o plasma seminal possui um dos fluidos antioxidantes mais poderosos já conhecidos, composto por inúmeras enzimas antioxidantes e sequestradores de radicais livres que, quando combinados, possui capacidade antioxidante cerca de 10 vezes maior que o sangue.

Entretanto, a exposição dos espermatozoides às baixas temperaturas de armazenamento durante o processo de conservação seminal, pode contribuir para o aumento das EROs e possível dano oxidativo. Processo pelo qual Flores *et al.* (2009) acreditam estar associado a diminuição da atividade dos mecanismos utilizados pela mitocôndria para eliminação das EROs. Além disso, a criopreservação de sêmen promove a redução dos agentes antioxidantes do plasma seminal pela adição do meio diluente, causando um desequilíbrio do sistema antioxidante natural, formado por agentes pró-oxidantes e antioxidantes (CABRITA *et al.*, 2011; MOTTA *et al.*, 2022).

A adição de compostos antioxidantes ao meio diluidor espermático a fim de reduzir o estresse oxidativo causado por EROs é um procedimento bastante estudado na criopreservação seminal de peixes. Esta abordagem vem sendo associada à manutenção da integridade da membrana espermática, aumento da motilidade, bem como a diminuição da fragmentação do DNA, peroxidação lipídica e formação das EROs (MOTTA *et al.*, 2022; SANDOVAL-VARGAS *et al.* 2021)

3.5 Compostos antioxidantes

Os antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos responsáveis pelo retardo ou inibição do processo de oxidação, podendo ser divididos quanto ao seu mecanismo de ação antioxidante, em primários e secundários e, quanto à atividade catalítica em enzimáticos e não enzimáticos (ABEYRATHNE *et al.*, 2022; FÉLIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; PISOSCHI *et al.*, 2021;).

Os antioxidantes enzimáticos podem possuir mecanismos de ação primária ou secundária. Os de ação primária caracterizam-se por combater a oxidação lipídica estabilizando ou eliminando os radicais livres por reações diretas. Dentre eles, destacam-se a enzima catalase (CAT), que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx), que catalisam os superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio (FÉLIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; STOIA; OANCEA, 2022). Já as enzimas secundárias, são classificadas como antioxidantes preventivos, pois agem indiretamente sobre a oxidação lipídica e na regeneração dos antioxidantes primários. São exemplos de enzimas secundárias a glutathione redutase (GR), que é responsável pela regeneração da glutathione (GSH); e a glicose-6-fosfato desidrogenase e a glutathione-S-transferase (FÉLIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; HERMUND, 2018; KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009).

O sistema de defesa não enzimático é formado principalmente por antioxidantes dietéticos que possuem uma grande variedade de características bioquímicas e mecanismos de ação. Dentre os quais podemos destacar a vitamina C (ácido ascórbico) e a vitamina E (α -tocoferol), que naturalmente estão presentes no plasma seminal. Enquanto a vitamina C elimina o efeito oxidativo dos radicais livres, a vitamina E evita a peroxidação lipídica da membrana e os danos causados ao DNA (AHMADI *et al.*, 2016; FÉLIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009).

Os aminoácidos também fazem parte do sistema de defesa não enzimático, dentre eles destacam-se a cisteína e a metionina que contribuem para o aumento da produção de glutathione (GSH) e, conseqüentemente, com a redução de EROs do organismo. Além destes, também são antioxidantes não enzimáticos os carotenóides (α -caroteno e β -caroteno), os polifenóis (flavonóides e não-flavonóides), as carnitinas (L-carnitina e L-acetil carnitina) e os antioxidantes de baixo peso molecular, como a melatonina (ELOKIL *et al.*, 2019; FÉLIX; OLIVEIRA; CABRITA, 2021; PISOSCHI *et al.*, 2021).

Dessa forma, com o intuito de diminuir os efeitos negativos causados pelo estresse oxidativo ao espermatozoide, a fim de melhorar a qualidade espermática pós-congelamento/ pós-resfriamento e obter melhores taxas de fertilização, estudos com adição de compostos antioxidantes nos diluidores seminais de diversas espécies são realizados e demonstram bons resultados na conservação de gametas de peixes (CABRITA *et al.*, 2011; FIGUEROA *et al.*, 2018; LÍ *et al.*, 2018). No entanto, ainda há necessidade de aprimorar os protocolos existentes de armazenamento seminal à curto prazo e verificar os efeitos e potencialidades dos diferentes

tipos de agentes antioxidantes à qualidade espermática de peixes. Dentre esses compostos estão os polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas.

3.5.1 Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros aniônicos de carboidratos encontrados nos mais diversos organismos presentes na natureza, tais como nas bactérias, fungos, algas, vegetais e animais (BEZERRA NETO *et al.*, 2008; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015). Essas macromoléculas naturais consistem em mais de dez unidades de monossacarídeos agrupados por ligações glicosídicas, com a presença do grupamento sulfato nos grupos hidroxilas das unidades de açúcar (HUANG *et al.*, 2019).

A presença do radical sulfato promove alterações na estereo-especificidade dos polissacarídeos, bem como na repulsão eletrostática, flexão e extensão da cadeia polissacarídica e o aumento da solubilidade em água, o que modifica as atividades biológicas desses polímeros (HUANG *et al.*, 2019; ZHAN-FENG; HAN-WEN, 2005). Os radicais sulfato podem atuar exercendo ação redutora pela doação de elétrons (JRIDI *et al.*, 2019), ação quelante com íons metálicos (ALBERTINI *et al.*, 2000; CAMPO *et al.*, 2006) e na formação de proteoglicanos ao ligar-se a proteínas da membrana e matriz extracelular (SOUSA *et al.*, 2016).

Estudos confirmam que os polissacarídeos sulfatados exibem atividades biológicas mais expressivas se comparados aos não sulfatados (HU *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2016). Ao verificarem as propriedades antioxidantes dos polissacarídeos sulfatados e dessulfatados extraídos da macroalga marinha *Undaria pinnatifida*, Hu *et al.* (2010) observaram que a fração sulfatada de polissacarídeo proporcionou atividades antioxidantes mais fortes do que a fração não sulfatada. Da mesma forma, Xie *et al.*, 2016 obtiveram melhores propriedades antioxidantes após a sulfatação química de polissacarídeo extraído da árvore *Cyclocarya paliurus*. Acredita-se que a presença do grupo sulfato exerça uma função auxiliar para a doação de hidrogênio dos polissacarídeos, contribuindo assim, com a atividade antioxidante (WANG *et al.*, 2010)

As macroalgas marinhas são as mais importantes fontes de polissacarídeos sulfatados de origem não animal (COSTA *et al.*, 2010), possuindo várias atividades biológicas tais como anticoagulante, antitrombótica (JIAO *et al.*, 2011), antitumoral (ZOROFCHIAN-MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014), antiviral (HEMMINGSON *et al.*, 2006), antimicrobiano (EOM *et al.*, 2012) e imunoestimulante (YANG *et al.*, 2011). Além disso, atuam em mecanismos de cardioproteção (THOMES *et al.*, 2010) e neuroproteção (LUO *et al.*, 2009),

possuem efeitos hipoglicemiantes (ZHONG *et al.*, 2021), além da comprovada ação antioxidante (JRIDI *et al.*, 2019; USOV *et al.*, 2022).

Devido a exposição à diferentes condições ambientais adversas, tais como a poluição, intensa radiação solar e altas concentrações de oxigênio que contribuem para formação de radicais livres, as macroalgas marinhas desenvolveram uma série de compostos capazes de proteger seu aparelho fotossintético (GUPTA; ABU-GHANNAM, 2011). Dentre eles estão os compostos que possuem atividade antioxidante, como os polissacarídeos sulfatados (CORNISH; GARBARY, 2010). Nas macroalgas marinhas, os PS estão presentes na matriz mucilaginosa da parede celular, protegendo-a contra a desidratação em períodos de maré baixa, servindo como reserva energética e para manutenção do equilíbrio iônico (DENIAUD-BOUET *et al.*, 2017).

A estrutura química dos polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas varia de acordo com a espécie, região anatômica do tecido, localização geográfica, época de colheita, e até mesmo o procedimento de extração (YUAN; MACQUARRIE, 2015). A complexidade na estrutura desses compostos se deve às diversas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos dos sulfatos, que são responsáveis pela diversidade de atividades biológicas atribuídas a estes compostos (ANAND *et al.*, 2016).

3.5.2 *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis 1863

A macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* (Figura 2) pertence ao grupo das algas marrons ou pardas, que são organismos pluricelulares típicos de mares frios e clima temperado, encontradas fixadas a substratos rochosos e formando florestas submersas ao longo de todo Atlântico Norte (OLSEN *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2004). Essa macroalga possui folhas com coloração marrom-oliva, mas que também podem ser encontradas amareladas em situações de estresse. Possuem um talo primário comprimido e com crescimento apical que se divide em longas ramificações em formato de tira, com morfologia semelhante (PEREIRA *et al.*, 2020).

Além disso, essas ramificações também podem formar ramos com crescimento limitado e com a presença de uma única bexiga central, que também está relacionada a flutuabilidade e propagação da macroalga. Durante o período reprodutivo, que ocorre na primavera, essas macroalgas desenvolvem e amadurecem os receptáculos nas extremidades das folhas. Essas estruturas originam e armazenam os conceptáculos, que são os locais onde ocorrem a formação e liberação dos gametas (PEREIRA *et al.*, 2020; STRASBURGER, 1994).

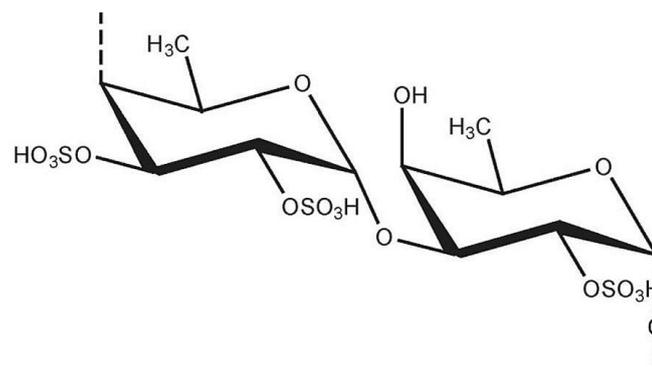
Figura 2 – Exemplar da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum*.



Fonte: <https://www.alamy.com>.

Segundo Pereira *et al.* (2020), as algas marrons possuem carboidratos que contém polímeros de fucose, também conhecidos como fucanos. Os fucanos são polissacarídeos sulfatados carregados negativamente, hidrossolúveis, encontrados na matriz extracelular das algas marrons. Dentre os mais estudados destaca-se o fucoidan, sua estrutura molecular (Figura 3) compreende em sua maior parte grupos L-fucose e sulfato e, em menores proporções, um ou mais grupos de xilose, galactose, manose, glicose, ramnose, arabinose, ácido glucurônico e grupos acetil (AROKIARAJAN *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2019; PRADHAN *et al.*, 2020).

Figura 3 – Estrutura molecular do fucoidan extraído de *Ascophyllum nodosum*.



Fonte: Arokiarajan *et al.* (2022).

O teor de sulfato encontrado na macroalga *Ascophyllum nodosum* varia entre 19 a 28%, e pode desempenhar um papel importante na atividade antioxidante. Sugere-se que o grupo sulfato atua na ativação do átomo de hidrogênio do carbono anomérico, contribuindo para a capacidade de doação de hidrogênio dos polissacarídeos (WANG *et al.*, 2010). Estudos

confirmaram que o fucoïdan sulfatado exibe atividades antioxidantes mais expressivas se comparados aos seus polissacarídeos dessulfatados (HU *et al.*, 2010).

Poucos estudos demonstraram os efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas na criopreservação seminal, dentre eles foi verificado que a adição de polissacarídeos sulfatados da macroalga vermelha *Solieria filiformis* ao meio de congelação seminal de tambaqui, promoveu bons resultados na integridade da membrana espermática (PEREIRA *et al.*, 2020). Enquanto que a suplementação com PS das macroalgas verdes *Ulva lactuca* e *Caulerpa racemosa* não interferiu sobre esse parâmetro espermático para a mesma espécie (LOBATO *et al.*, 2022).

Ao ser verificado a suplementação do meio criodiluidor com PS de uma macroalga vermelha (*Gracilaria domingensis*) e verde (*Ulva fasciata*), durante a congelação seminal de *Prochilodus brevis*, não foram observados efeitos sobre a integridade da membrana espermática da espécie (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Em um estudo sobre o resfriamento seminal de *Prochilodus brevis*, Sales *et al.* (2023) avaliaram os efeitos da adição diferentes concentrações de PS da macroalga vermelha (*Gracilaria domingensis*) sobre a qualidade espermática da espécie pós-resfriamento. Os autores observaram que essa suplementação não promoveu efeitos negativos sobre os parâmetros espermáticos, mantendo a viabilidade dos gametas em até 72 horas de armazenamento a curto prazo.

Sugerindo, novamente, que os efeitos dos PS sobre os parâmetros de qualidade espermática são dependentes das interações promovidas pela fonte e concentração dos polissacarídeos com o sêmen da espécie (CABRITA *et al.*, 2011) e, possivelmente, também é dependente do método de conservação empregado.

4 JUSTIFICATIVA

O tambaqui (*C. macropomum*) é uma espécie de elevada importância para aqüicultura nacional, sendo a espécie nativa mais produzida no Brasil. Além disso, apresenta relevância ecológica pela dispersão de sementes ao longo da bacia amazônica e relevante papel social para as comunidades pesqueiras, que o consomem por subsistência. Apesar disso, populações selvagens de tambaqui enfrentam desafios devido a ação antrópica, tais como a poluição, construção de barragens e pesca predatória.

Dessa forma, a produção aquícola de *C. macropomum* busca a redução da sobrepesca dos estoques naturais, bem como suprir a crescente demanda do mercado por este pescado. Nesse cenário, avanços em biotécnicas reprodutivas são essenciais para a produção artificial desta espécie, dentre elas destaca-se o resfriamento seminal. Essa técnica permite a conservação de gametas à curto prazo, ao longo de horas ou dias, o que permite utilizar espermatozoides no momento mais adequado para fertilização. Além disso, facilita o intercâmbio controlado de espermatozoides entre instituições de pesquisa e pisciculturas, diminuindo os riscos de endocruzamento e transporte de reprodutores.

Todavia, a exposição do sêmen às baixas temperaturas pode contribuir para o estresse oxidativo e promover danos aos gametas. Assim, busca-se aprimorar os protocolos de resfriamento seminal já vigentes para peixes, na tentativa de melhorar a qualidade espermática do sêmen pós-resfriamento. Para o tambaqui existem poucos trabalhos com o uso de resfriamento seminal. Estes por sua vez, concentram-se em testes com diferentes soluções diluidoras, adição de crioprotetores ao meio diluente e na verificação dos efeitos do resfriamento a curto prazo sobre a qualidade espermática.

A suplementação do meio de congelação com compostos que possuem propriedades antioxidantes é uma abordagem recente e que apresenta bons resultados para a criopreservação do sêmen de peixes. Dentre estes compostos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas, que podem atuar como sequestradores de radicais livres e agentes quelantes de íons metálicos, impedindo o dano oxidativo contra as células espermáticas.

Essas moléculas podem ser utilizadas aos meios diluentes do resfriamento seminal, visto que possuem capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) e preservar a integridade estrutural dos espermatozoides. Entretanto, a suplementação com estes diferentes compostos ainda não foi testada para o armazenamento à curto prazo de *C. macropomum*. Essas substâncias podem apresentar diferentes modos de interações e efeitos sobre as células espermáticas, além de possuírem uma ação espécie-específica.

Desse modo, este trabalho justifica-se pela necessidade da otimização do processo de resfriamento seminal de tambaqui, para obtenção de uma melhor qualidade dos espermatozoides pós-resfriados e potencialização da capacidade fertilizante espermática, a partir da utilização de polissacarídeos sulfatados extraídos de *A. nodosum*. Uma vez que os efeitos dos PS sobre os parâmetros de qualidade espermática dependem das diferentes interações promovidas pela fonte e concentração dos polissacarídeos com o sêmen da espécie e do método de conservação empregado. Até então, este é o primeiro estudo que demonstra os efeitos desses polímeros sobre a qualidade espermática de tambaqui utilizando o método de resfriamento seminal à 4 °C.

Assim, essa tecnologia pode ser utilizada para o uso em pisciculturas, como modo de transporte do material genético de uma propriedade à outra, sem a necessidade de deslocar os reprodutores, diminuindo, portanto, as condições de estresse animal e a disseminação de doenças entre os empreendimentos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do trabalho

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Fortaleza/ CE. (003°79'33'' S; 038°55'83'' W).

5.2 Extração de Polissacarídeos Sulfatados

A macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* foi adquirida em site de comercialização sob forma liofilizada e levada ao Laboratório de Bioquímica Marinha (LBM), do Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA), do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP), da Universidade Federal do Ceará (UFC) para extração dos polissacarídeos sulfatados com base na metodologia descrita por Farias *et al.* (2000). Resumidamente, uma amostra de 5 g da macroalga foi suspensa em 100 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), contendo 510 mg de papaína, 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína, e incubada a 60 °C por 24 h. Em seguida, a mistura de incubação foi filtrada e o sobrenadante coletado e armazenado. Os polissacarídeos sulfatados presentes na solução foram precipitados com 16 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio a 10% em temperatura ambiente por 24 horas.

A mistura foi então centrifugada (9.560 x g, por 20 min) e o precipitado contendo os PS foi lavado com 100 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio a 0,05 %, dissolvido em 100 mL de solução de NaCl:etanol 2M (100:15, v/v) e precipitado por 24 h a 4 °C com 100 mL de etanol comercial. Em seguida, o precipitado obtido foi centrifugado (9.560 x g, por 20 min), lavado por duas vezes com 100 mL de etanol 80% e uma vez com o mesmo volume de etanol comercial. Finalmente, os polissacarídeos sulfatados foram colocados para secar em estufa de secagem ao ar (60 °C, por 6 horas) e o rendimento foi expresso em porcentagem (%) da matéria desidratada.

Todos os polissacarídeos sulfatados extraídos foram liofilizados e, posteriormente, adicionados ao meio diluente de resfriamento seminal na concentração prevista para este estudo (0,25; 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹).

5.3 Animais experimentais e coleta seminal

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA), da Universidade Estadual do Ceará (UECE), sob número do protocolo 10519830/2021.

Para realização dos experimentos foram utilizados planteis de tambaquis adultos com peso corporal médio de $6,4 \pm 0,8$ kg, para machos, e $8,5 \pm 1,0$ kg, para fêmeas. Os animais foram mantidos em um tanque de alvenaria (15,0 x 6,0 x 1,1 m) com aeração contínua fornecida pelo funcionamento de um compressor radial de 1,74 CV (Figura 4). Cinco unidades de difusores de ar do tipo mangueiras micro perfuradas, cada uma com 70 cm de comprimento, foram distribuídas ao longo do tanque, para manutenção dos níveis de oxigênio dissolvido na água acima de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Os animais foram alimentados com ração comercial para peixes onívoros, com índice proteico de 32% de proteína bruta, fornecida diariamente duas vezes ao dia, a uma taxa de 5% da biomassa estocada por dia.

Figura 4 – Tanque de alvenaria onde os animais experimentais permaneceram estocados.



Fonte: Autor.

Para coleta seminal foram selecionados vinte e cinco machos de *C. macropomum* que apresentaram características indicativas de maturidade reprodutiva, tais como: papila urogenital hiperêmica e liberação de sêmen sob leve massagem abdominal. Esses animais foram induzidos hormonalmente à reprodução pela aplicação de dose única de Ovopel[®] ($0,3 \text{ pélete.kg}^{-1}$ de peso vivo; segundo recomendações propostas por Souza *et al.*, 2018), administrado por via intracelomática. Após 14 horas da aplicação, os animais foram sedados em solução de Eugenol (Sigma-Aldrich[®]), na proporção 1:10:10.000 (Eugenol: álcool: água) até que a perda do equilíbrio fosse observada, para facilitar a contenção do animal e minimizar o estresse do animal (DE ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2020). Posteriormente, o sêmen foi coletado em seringas estéreis por meio de leve massagem abdominal no sentido crânio-caudal e transferido

para tubos graduados de polietileno mantido em caixa isotérmica até o processamento das amostras em laboratório.

As amostras coletadas foram analisadas para formação de *pools* de sêmen, para em seguida, serem adotados os procedimentos de resfriamento. O sêmen fresco (*in natura*) foi verificado quanto à motilidade espermática e aquelas amostras que apresentarem espermatozoides móveis acima de 85% foram usadas para formação dos *pools*, que por sua vez foram aliquotados para a composição dos tratamentos experimentais.

5.4 Diluição Seminal e Desenho Experimental

Após a análise preliminar do sêmen de cada animal foram formados oito *pools*, cada um constituído por alíquotas de 300 µL de sêmen de três machos (n=24). Posteriormente foram analisadas a cinética espermática, a morfologia, a integridade de membrana e a integridade de DNA das amostras de sêmen *in natura*, ou seja, *pools* sem diluição. Os oito *pools* de sêmen de cada tratamento foram diluídos (1:5 – sêmen: diluidor) e resfriados em solução contendo como diluente a água de coco em pó, específica para peixes (ACP[®] -104, ACP Biotecnologia, Fortaleza; 310 mOsm.kg⁻¹ H₂O), 0,1 mg mL⁻¹ de gentamicina (Gentatec[®]) e suplementados com as diferentes concentrações (0,0; 0,25; 0,50 ou 0,75 mg.mL⁻¹) de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *A. nodosum*. Essas concentrações foram baseadas em estudos recentes que verificaram a utilização dessas macromoléculas, extraídas de diferentes macroalgas marinhas, no meio de criopreservação seminal de tambaqui (LOBATO *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2020) e curimatã comum (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; SALES *et al.*, 2023). Um tratamento contendo sêmen *in natura* foi resfriado sem a presença do diluente e dos PS, utilizado como segundo controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento experimental.

Tratamento	Designação ¹	Concentração	
		ACP (proporção)	PS (mg.mL ⁻¹)
T1	<i>IN NATURA</i>	0 ²	0 ³
T2	ACP	1:5	0
T3	ACP-PS-0,25	1:5	0,25
T4	ACP-PS-0,50	1:5	0,50
T5	ACP-PS-0,75	1:5	0,75

¹*IN NATURA*: sêmen *in natura* sem a adição do diluente e de polissacarídeos sulfatados, grupo controle; ACP: sêmen com adição da água de coco em pó (diluente) sem adição de polissacarídeos sulfatados, segundo grupo controle; ACP-PS-0,25, ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75: grupos experimentais, sêmen com diluído em água de coco em pó suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹ de polissacarídeos sulfatados de *Ascophyllum nodosum*. ²Fator de diluição do sêmen *in natura* com o diluente (1:5; sêmen:ACP). ³Concentrações de PS adicionado ao diluente.

Em seguida, as amostras foram alocadas em microtubos de polietileno e acondicionadas a temperatura próxima à 4° C em refrigerador, em que foram mantidas durante os seguintes períodos de refrigeração: zero, seis, 12, 24, 48 e 72 horas. Durante cada período citado, as amostras foram analisadas quanto a cinética espermática, morfologia, integridade de membrana e integridade de DNA.

Ao final do resfriamento seminal foi realizado o teste de fertilização utilizando o tempo de resfriamento que melhor manteve os parâmetros de qualidade espermática após o resfriamento seminal, para validação do sucesso das técnicas de resfriamento e verificação da capacidade fecundante dos espermatozoides resfriados de tambaqui (PAES *et al.*, 2014).

5.5 Análises espermáticas

A cinética espermática foi avaliada levando em consideração às análises de motilidade total (%), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m.s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL- $\mu\text{m.s}^{-1}$) e velocidade do percurso (VAP- $\mu\text{m.s}^{-1}$). Esses parâmetros foram obtidos pela utilização do sistema de análise seminal auxiliado por computador (CASA), com o uso do software *Sperm Class Analyser* (SCA - Microptics[®]), utilizando a configuração indicada para peixes. Para essa análise, foi pipetado 5 μL de sêmen de cada amostra e depositado em câmara de Makler, em seguida foi homogeneizado em 95 μL de solução ativadora de NaCl (125 mM) e submetido imediatamente às análises (NUNES *et al.*, 2016).

A análise de integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi realizada pelo método de coloração com eosina-nigrosina (BLOM, 1950), sendo confeccionada uma lâmina por *pool* na proporção 1:2:2 (sêmen:eosina:nigrosina), de modo que 10 μL dessa mistura foram utilizados para a confecção das lâminas, pelo método de esfregaço. Utilizando microscópio óptico (Opton Microscope; Tucsen, China) com aumento de 400x, 200 espermatozoides por lâmina foram analisados e considerados com a membrana íntegra, quando se apresentarem incolores, ou com membrana rompida, quando corados de rosa ou vermelho.

Para a análise da morfologia espermática, o sêmen foi fixado em solução de citrato-formol a 4% (10:100; sêmen:fixador) e, em seguida, corado com Rosa Bengala na proporção

de 1:10 (corante:sêmen fixado). Foi confeccionada, por meio de esfregaço, uma lâmina por *pool*, contendo 10 μL da solução corante-sêmen fixado, na qual foram avaliados 100 espermatozoides por lâmina, com o auxílio de microscópio óptico (Opton Microscope; Tucsen, China) com aumento de 400x. As células espermáticas foram classificadas como normais ou com algum defeito morfológico de acordo com Miliorini *et al.* (2011). Tais deformidades podem ser classificadas como primárias (macro e microcefalia, cabeça degenerada, cauda quebrada, cauda curta e cauda fortemente enrolada) ou secundárias (cabeça livre normal, gota proximal, gota distal e cauda dobrada).

A análise de integridade de DNA foi realizada pelo teste *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD), baseado na taxa de fragmentação da cromatina espermática, seguindo a metodologia proposta por Fernandez *et al.* (2005). Para isso, 2,0 μL do sêmen fresco foram diluídos em 1,5 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e mantidos em banho maria à 37 °C até sua utilização. Em seguida, 25 μL de solução sêmen-PBS foi misturado com 50 μL de agarose de baixo peso molecular (LOW, Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, EUA), posteriormente foram retirados 2,0 μL desta mistura e depositados em 10 pontos de uma lâmina previamente preparada com agarose altamente purificada (NA Agarose; Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, EUA). Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em uma superfície metálica resfriada à 4 °C por cinco minutos. Seguidamente foram submetidas a banhos em diferentes soluções: solução ácida (ácido clorídrico (HCl) e água ultrapura, durante sete minutos; solução de Lise (cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio dodecil (SDS; $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), solução de triton X, ácido etileno diaminotracético (EDTA), β -mercaptoetanol, solução Tris-HCL e água destilada, durante 25 minutos); água destilada (durante cinco minutos); e álcool 70%, álcool 90% e álcool absoluto, respectivamente (durante dois minutos cada).

Após o procedimento de banho, as amostras foram coradas com um kit panótico (RenyLab Chemical and Pharmaceutical Ltda., Barbacena County, MG, Brasil); e cada lâmina foi mergulhada em cada corante por 10, 20 e 20 segundos, respectivamente. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. Então, 250 espermatozoides por amostra de cada animal foram avaliados usando um microscópio de contraste de fase acoplado à câmera (200; Nikon Eclipse 50 i, Tóquio, Japão) para investigar a incidência de halo em torno da cabeça do espermatozoide. Nesta análise, células com halo externo indicam dispersão de cromatina espermática (DNA intacto), enquanto células livres de halo indicam fragmentação do DNA espermático.

5.6 Taxa de Fertilização

Após a realização do experimento para obtenção da melhor concentração de polissacarídeos sulfatados e melhor tempo de armazenamento a curto prazo, foram realizados testes de fertilização e acompanhamento do desenvolvimento embrionário dos embriões obtidos dos tratamentos resfriados neste tempo específico.

Para isso, seis reprodutores de *C. macropomum* que apresentaram indicativos de maturidade reprodutiva tais como a liberação de sêmen sob leve pressão abdominal e papila urogenital hiperêmica para os machos, abdômen abaulado e papila urogenital hiperêmica para fêmeas, foram selecionados e induzidos à reprodução. Os machos ($n=3$) receberam dosagem única do hormônio sintético Ovopel[®] de $0,3 \text{ pélete.kg}^{-1}$ do peso corporal, de acordo com Souza *et al.* (2018), enquanto que as fêmeas ($n=3$; peso médio de $8,5 \pm 1,0 \text{ kg}$) receberam a aplicação de duas dosagens de extrato pituitário de carpa (EPC), ambas por via intracelomática. A primeira aplicação nas fêmeas foi de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ do peso corporal. Após 12 horas da indução foi realizada a segunda aplicação de EPC nas fêmeas na concentração de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal (WOYNAROVICH, 1986) e, concomitantemente, a aplicação única de Ovopel[®] nos machos. Os três machos utilizados nessa fase pertenceram ao grupo controle de sêmen 100% fresco, coletado para formação de um *pool* no momento da fertilização, que ocorreu concomitantemente a fertilização das amostras de sêmen previamente resfriadas.

Após a segunda indução hormonal nas fêmeas, foi realizado o acompanhamento da temperatura da água em que os reprodutores estavam em intervalos de uma e uma hora para obtenção das horas-graus, que consiste no somatório das temperaturas, a partir da última indução, que coincide com o momento aproximado da maturação final e ovulação das fêmeas. Para o tambaqui, as horas-graus variam entre 260 a 280 (WOYNAROVICH, 1986). Em seguida, os animais foram sedados em solução de Eugenol (Sigma-Aldrich[®]) na proporção 1:10:10.000 (Eugenol: álcool: água) e o sêmen e ovócitos foram coletados por meio de leve massagem abdominal no sentido craniocaudal, onde foram posteriormente armazenados sob refrigeração em tubos graduados e recipientes de polietileno, respectivamente.

Alíquotas das amostras foram analisadas quanto as concentrações espermáticas e de ovócitos. A concentração espermática foi calculada por meio de contagem das células presentes em uma alíquota de $1,0 \mu\text{L}$ de sêmen, em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de óptico (Opton Microscope; Tucsen, China) com aumento de 400x. Enquanto que a concentração de ovócitos foi calculada a partir da contagem de $1,0 \text{ g}$ da amostra, utilizando um estereomicroscópio binocular com aumento de $0,8$ a $5x$ (Opton, China).

A fertilização foi realizada a seco, para isso, os espermatozoides foram misturados aos ovócitos cuidadosamente, seguindo a proporção recomendada por Leite *et al.* (2013) de $5,0 \times 10^4$ a $2,0 \times 10^6$ espermatozoides para cada ovócito. Em seguida, foi adicionado 100 mL de água para hidratação e realizada uma sutil homogeneização durante um minuto. Posteriormente, os ovos já fecundados foram transferidos para incubadoras cilíndricas em sistema de recirculação de água onde foram mantidas para acompanhamento do desenvolvimento embrionário e verificação da taxa de fertilização.

Para o cálculo da taxa de fertilização, uma amostra de embriões foi cuidadosamente coletada de cada incubadora e depositada em placa de Petri. Posteriormente, foi calculada a porcentagem de ovos fertilizados a partir da contagem de 200 embriões em estereomicroscópio. A taxa de fertilização foi determinada no momento em que os embriões alcançaram a fase de gástrula (COELHO *et al.*, 2021).

5.7 Análises estatísticas

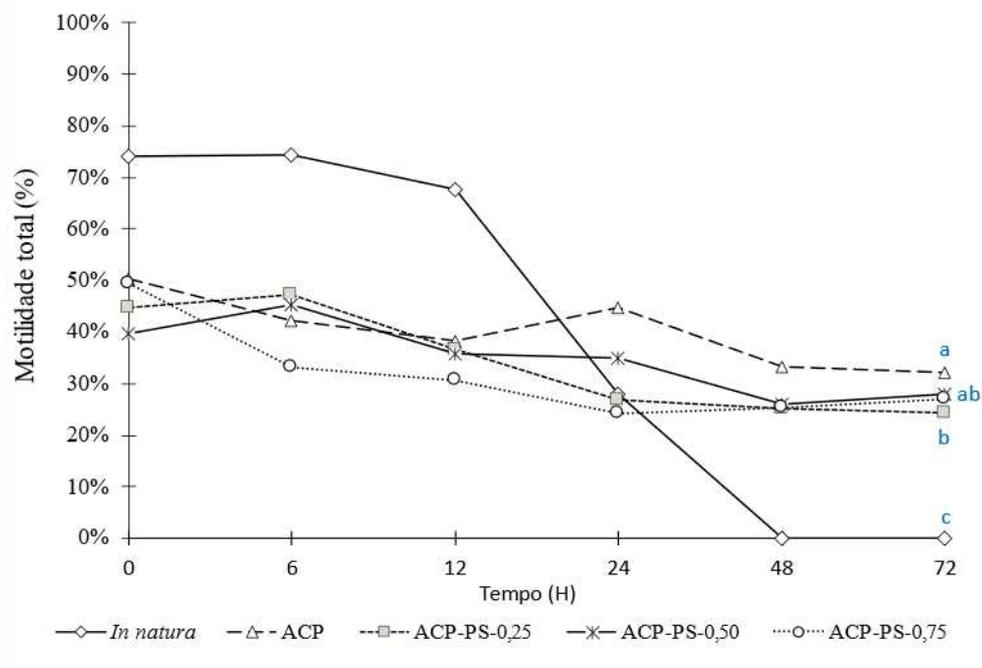
Os dados da qualidade espermática foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição dos resíduos, e de Levene para verificar homogeneidade da variância entre os tratamentos. Em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em arranjo fatorial 5 x 6 de tratamentos com polissacarídeos sulfatados (*in natura*; ACP; ACP-PS-0,25; ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75) e tempo (zero, seis, 12, 24, 48 e 72 horas). Ao ser verificada diferença estatística foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias. As variáveis de desenvolvimento embrionário foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para experimentos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), seguido do teste de Tukey. O nível de significância adotado em todos os testes estatísticos foi de 5%. O software “SigmaPlot 12.0” foi utilizado para à análise estatística dos resultados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os *pools* de sêmen fresco, ou seja, não diluídos, a taxa média de motilidade total foi de $74,1 \pm 9,5\%$, a VCL foi de $70,9 \pm 13,7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, a VSL de $39,4 \pm 11,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ e a VAP de $56,7,9 \pm 12,8 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. A proporção de espermatozoides morfologicamente normais foi $91,87 \pm 3,5\%$ e os parâmetros de integridade da membrana plasmática e integridade do DNA espermático foram de $92,4 \pm 1,7\%$ e $86,7 \pm 2,64\%$, respectivamente.

A partir do tempo zero (H0), ou seja, momento em que foram diluídos os *pools* de sêmen fresco com a solução de ACP[®]-104, gentamicina e as diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados, houve uma redução significativa da taxa de motilidade total, assumindo valores entre 40 e 50% (Figura 5), até mesmo para o tratamento controle (ACP), contendo somente o meio diluidor e gentamicina. Enquanto que o tratamento controle *in natura*, sofreu menores perdas na motilidade total ($74,1 \pm 9,5\%$), mantendo esse comportamento após seis (H6) e doze horas (H12). No entanto, após 24, 48 e 72 horas de resfriamento, os tratamentos diluídos em ACP[®]-104, suplementados ou não com PS, apresentaram maiores taxas de motilidade se comparados ao grupo controle *in natura*.

Figura 5 – Motilidade total (%) dos espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* ($n = 8$ *pools*).



In natura: sêmen não diluído sem adição de PS. ACP: Sêmen diluído em ACP[®]-104 sem adição de PS. ACP-PS-0,25, ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75: sêmen com diluído em ACP[®]-104 suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹ de PS, respectivamente. Na última hora de resfriamento (72 h), médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA, $P < 0,05$).

Comportamento semelhante foi verificado por De Oliveira *et al.* (2022), que ao avaliarem o sêmen de tambaqui diluído em ACP[®]-104 durante resfriamento à 4 °C, observaram uma menor taxa de motilidade total dos espermatozoides após diluição ($88,31 \pm 0,96\%$), se comparado ao grupo controle não diluído ($94,13 \pm 2,4\%$). Semelhantemente ao presente trabalho, esses autores observaram que a partir de determinado tempo de resfriamento, os tratamentos diluídos foram, significativamente, superiores ao grupo controle, sem diluição.

Em até 12 horas de resfriamento não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as taxas de motilidade total dos tratamentos ACP ($38,28 \pm 11,6\%$), ACP-PS-0,25 ($36,7 \pm 9,7\%$), ACP-PS-0,50 ($35,21 \pm 10,4\%$) e ACP-PS-0,75 ($30,69 \pm 10,1\%$). No entanto, ambas foram estatisticamente inferiores ao tratamento *in natura* ($67,7 \pm 9,3\%$; $P < 0,05$). Após 24 horas em armazenamento à 4 °C foi observado uma queda acentuada nos valores de motilidade total para o tratamento *in natura*, assumindo valor médio de $27,9 \pm 6,5\%$ e, posteriormente, de 0,0% após 48 e 72 horas (Figura 4). Isso justifica a necessidade do uso do diluidor em sêmen de tambaqui resfriado quando os períodos de estocagem a 4 °C forem iguais ou superiores a 24 horas.

Melhores resultados de motilidade total foram observados em até 24 horas de resfriamento seminal para o tratamento ACP ($44,8 \pm 10,7\%$), seguido do tratamento ACP-PS-0,50 ($35,0 \pm 5,7\%$), ambos sem diferença estatística entre si ($P > 0,05$). Apesar de baixos, os valores de motilidade total destes grupos foram superiores aos encontrados por Menezes *et al.* (2008) durante a pós-congelação seminal de tambaqui. Esses autores obtiveram uma taxa de fertilização de 76% com apenas 20% de espermatozoides móveis. Esse resultado sugere que as taxas de motilidade espermática verificadas no presente estudo em até 24 horas de resfriamento, podem ser suficientes para obtenção de uma taxa de fertilização aceitável. Tal fato justifica-se pelo aumento da quantidade de espermatozoides durante a fertilização, que de certa forma, compensam a perda de motilidade total (BILLARD *et al.*, 2004)

A partir de 24 h, para o tratamento ACP, houve perda da motilidade e aparente estabilização para valores próximos a 30%, assumindo valor final de $32,1 \pm 9,4\%$ em 72 horas de armazenamento, sem diferenças significativas ($P > 0,05$) dos tratamentos ACP-PS-0,50 ($27,5 \pm 2,7\%$) e ACP-PS-0,75 ($27,8 \pm 2,5\%$). O resfriamento seminal leva a célula a um estado de quiescência, que reduz o metabolismo e proporciona a redução dos gastos energéticos e produção de catabólicos tóxicos, contribuindo para a preservação celular (LEITE *et al.*, 2011). O comportamento estável a partir de 24 horas e a ausência de diferenças na motilidade total ao final de 72 horas entre os tratamentos diluídos suplementados (ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75) ou não (ACP), podem estar relacionados às interações entre os espermatozoides e o meio

diluidor, associados ao tempo de estabilização espermática durante o período de resfriamento seminal.

Além disso, a redução da taxa de motilidade observada ao longo do resfriamento espermático pode ser resultante da ação específica ou da interação entre alguns fatores, tais como a contaminação bacteriana (RURANGWA *et al.*, 2001), déficit de oxigênio no meio (BILLARD *et al.*, 2004), exposição à solução diluidora (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022) e ao envelhecimento espermático natural (CONTRERAS *et al.*, 2020). No presente estudo foi adicionado ao meio diluente 0,1 mg.mL⁻¹ de gentamicina como recomendado por Viveiros *et al.*, 2010, para evitar o crescimento bacteriano. Ademais, os melhores resultados de motilidade dos tratamentos com o diluidor ACP pode ser justificado pela função nutritiva e energética que este componente proporciona às células espermáticas, uma vez que a água de coco em pó é rica em açúcares, tais quais, a glicose e frutose (AROUCHA; VIANNI, 2002; CARVALHO *et al.*, 2014).

Billard *et al.* (2004) sugerem que a necessidade de oxigênio pode estar associada aos estoques de ATP, que se esgotam em condições anóxicas e resultam na perda de motilidade total. Por outro lado, estudos realizados com seis espécies de peixes de água doce brasileiros não verificaram diferenças entre os espermatozoides mantidos ou não sob refrigeração rica em oxigênio (MARQUES; GODINHO, 2004). O envelhecimento espermático é causado por um conjunto de alterações relacionadas à redução da motilidade e capacidade fecundante dos espermatozoides, isso ocorre devido a ação do tempo sobre os gametas e está relacionado à idade reprodutiva dos peixes ou à manipulação *in vitro* dos gametas (CONTRERAS *et al.*, 2020). O estresse oxidativo pode acelerar o processo de envelhecimento celular durante o resfriamento, que por si só, é um agente estressor para liberação de radicais livres.

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros de carboidratos encontrados nos mais diversos organismos presentes na natureza, como nos tecidos dos animais, invertebrados e vegetais (BEZERRA NETO *et al.*, 2008). As macroalgas marinhas são as mais importantes fontes de PS de origem não animal (COSTA *et al.*, 2010), possuindo várias atividades biológicas tais como anticoagulante e antitrombótica (JIAO *et al.*, 2011), antitumoral (ZOROFCHIAN-MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014), antiviral (HEMMINGSON *et al.*, 2006), antimicrobiano (EOM *et al.*, 2012), imunoestimulante (YANG *et al.*, 2011), atua em mecanismos de cardioproteção (THOMES *et al.*, 2010) e neuroproteção (LUO *et al.*, 2009), possui efeitos hipoglicemiantes (ZHONG *et al.*, 2021), além da comprovada ação antioxidante (COSTA *et al.*, 2010; JRIDI *et al.*, 2019; USOV *et al.*, 2022).

A estrutura química desses polímeros varia de acordo com as espécies, região anatômica do tecido, localização geográfica, época de colheita, e até mesmo o procedimento de extração (YUAN; MACQUARRIE, 2015). A complexidade na estrutura desses compostos se deve às diversas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos dos sulfatos, que são responsáveis pela diversidade de atividades biológicas atribuídas a estes compostos (ANAND *et al.*, 2016).

A macroalga *Ascophyllum nodosum* pertence ao grupo das algas marrons ou pardas, que são organismos pluricelulares típicos de mares frios, encontradas fixadas a substratos e formando florestas submersas (ROCHA *et al.*, 2004). Das algas marrons extrai-se os fucoidans (Heterofucanas), que são uma classe de polissacarídeos sulfatados carregados negativamente, hidrossolúveis e encontrados na matriz extracelular das algas. As diversas ações biológicas dos fucoidans são dependentes das interações entre os grupos sulfato com as diferentes proteínas e de fatores como as ramificações e pesos moleculares (USOV *et al.*, 2022). O teor de sulfato encontrado na macroalga *A. nodosum* varia entre 19 a 28%, e pode desempenhar um papel importante na atividade antioxidante (YUAN; MACQUARRIE, 2015).

Sugere-se que o grupo sulfato atua na ativação do átomo de hidrogênio do carbono anomérico, contribuindo para a capacidade de doação de hidrogênio dos polissacarídeos (WANG *et al.*, 2010). Estudos confirmaram que o fucoidan sulfatado exibe atividades antioxidantes mais expressivas se comparados aos seus polissacarídeos dessulfatados (HU *et al.*, 2010). O teor de sulfato do fucoidano diminui com a temperatura de extração, apresentando concentração máxima registrada (28%) quando extraído à 90 °C (YUAN; MACQUARRIE, 2015).

As velocidades curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do trajeto (VAP) dos espermatozoides de tambaqui submetidos ao resfriamento seminal, com ou sem suplementação de PS, sofreram variações entre os tratamentos e os diferentes tempos de armazenamento à 4 °C (Tabela 2).

A VCL do tratamento *in natura*, ou seja, sêmen resfriado sem diluente e PS, apresentou grande declínio em seus valores a partir de 24 h de resfriamento ($19,4 \pm 4,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) em relação a 12 h ($100,3 \pm 12,3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Comportamento semelhante foi observado a partir de 24 h para a VSL ($7,1 \pm 1,9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e VAP ($9,1 \pm 3,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), em relação a hora 12 ($84,6 \pm 11,6$ e $116,4 \pm 10,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente).

Tabela 2 – Velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e velocidade média do percurso (VAP; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) resfriado em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* ($n = 8$ pools).

Tempo	Tratamento					
	<i>In natura</i> ²	ACP ³	ACP-PS-0,25 [*]	ACP-PS-0,50 [*]	ACP-PS-0,70 [*]	
VCL	H0 ¹	70,9 ± 13,7 bA ⁴	55,2 ± 18,5 abA	53,7 ± 14,5 bA	55,4 ± 18,2 aA	62,4 ± 17,6 aA
	H6	87,6 ± 24,4 aA	65,2 ± 28,0 aB	65,4 ± 12,7 aB	38,1 ± 16,3 bC	28,5 ± 9,5 bC
	H12	100,3 ± 12,3 aA	56,2 ± 19,6 abB	54,5 ± 7,7 bB	30,8 ± 5,7 bcC	18,8 ± 2,7 bD
	H24	19,4 ± 4,5 cB	55,8 ± 18,7 abA	21,9 ± 7,5 cB	32,6 ± 15,3 bcA	17,3 ± 1,5 bB
	H48	0,0 ± 0,0 dC	20,9 ± 4,3 cA	16,6 ± 1,2 cB	16,7 ± 0,7 cB	16,7 ± 1,4 bB
	H72	0,0 ± 0,0 dC	33,6 ± 10,4 bcA	21,7 ± 2,9 cB	18,6 ± 1,5 cB	20,9 ± 2,9 bB
	VSL	H0	39,4 ± 11,2 bA	34,6 ± 11,9 abA	33,5 ± 12,3 aA	35,0 ± 16,1 aA
H6		54,7 ± 14,2 bA	39,6 ± 19,7 aA	39,6 ± 10,4 aA	22,7 ± 12,6 bB	15,1 ± 3,9 bB
H12		84,6 ± 11,6 aA	33,8 ± 14,5 abB	34,2 ± 6,4 aB	15,0 ± 4,4 bC	4,6 ± 2,3 cD
H24		7,1 ± 1,9 cC	44,4 ± 15,5 aA	3,5 ± 2,1 bC	16,4 ± 12,8 bcB	2,8 ± 1,4 cC
H48		0,0 ± 0,0 dB	9,7 ± 8,8 cA	2,4 ± 1,0 bB	2,3 ± 0,5 dB	2,8 ± 1,2 cB
H72		0,0 ± 0,0 dC	20,4 ± 7,2 bA	7,0 ± 2,6 bB	5,0 ± 2,8 cdB	6,1 ± 2,6 cB
VAP		H0	56,7 ± 12,8 cA	46,2 ± 15,3 aA	43,2 ± 10,5 bA	42,7 ± 9,9 aA
	H6	75,7 ± 17,0 bA	56,2 ± 19,1 aB	57,2 ± 10,5 aB	30,2 ± 13,8 bC	20,4 ± 2,4 bC
	H12	116,4 ± 10,1 aA	47,6 ± 12,8 aB	46,3 ± 8,1 bB	21,6 ± 3,0 cC	2,9 ± 1,0 cD
	H24	9,1 ± 3,2 dBC	52,1 ± 12,7 aA	9,7 ± 5,4 dBC	17,2 ± 8,5 cB	6,5 ± 1,2 cC
	H48	0,0 ± 0,0 dC	12,5 ± 6,5 bA	6,1 ± 1,3 dB	5,9 ± 0,6 dB	6,7 ± 1,9 cB
	H72	0,0 ± 0,0 dC	22,8 ± 8,9 cA	22,8 ± 8,9 cA	9,4 ± 3,4 dB	10,3 ± 2,8 cB

ANOVA Bifatorial			
Fator	P-valor		
	VCL	VSL	VAP
Tratamento	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Tempo	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Tratamento x Tempo	< 0,001	< 0,001	< 0,001

¹H0: hora zero de resfriamento (momento da diluição); H6, H12, H24, H48 e H72: Horas 6, 12, 24, 48 e 72 de resfriamento, respectivamente. ²*In natura*: sêmen não diluído sem adição de PS. ³ACP: Sêmen diluído em ACP[®]-104 sem adição de PS. ^{*} Sêmen diluído em ACP[®]-104 suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹ de PS. Resultados expressos em média ± desvio padrão. ⁴ Para uma mesma variável, médias com letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna, são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA; $P < 0,05$). Médias com letras maiúsculas distintas, em uma mesma linha, são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA; $P < 0,05$).

A partir de 48 horas de resfriamento, os valores de VCL, VSL e VAP foram reduzidos a zero. Enquanto que o tratamento ACP, ou seja, sêmen resfriado diluído em ACP[®]-104 sem adição de PS, após 24 h de armazenamento manteve os valores de VCL ($55,8 \pm 18,7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), VSL ($44,4 \pm 15,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e VAP ($52,1 \pm 12,7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) em comportamento próximo a estabilidade ($P > 0,05$), em relação às horas zero (H0), seis (H6) e doze (H12). Esse resultado reitera a

importância e eficácia do uso de ACP[®]-104 como diluidor durante o processo de resfriamento seminal de tambaqui à 4 °C. Alguns trabalhos demonstraram a eficácia do ACP[®]-104 quando empregado como diluidor durante o resfriamento e congelamento seminal de *C. macropomum*, *Prochilodus brevis* e *Cyprinus carpio* (DE ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; DO NASCIMENTO *et al.*, 2017; LINHARES *et al.*, 2015).

Além disso, a VCL em até 24 h, foi estatisticamente superior aos tratamentos *in natura* ($19,4 \pm 4,5 \mu\text{m.s}^{-1}$), ACP-PS-0,25 ($21,9 \pm 7,5 \mu\text{m.s}^{-1}$) e ACP-PS-0,75 ($17,3 \pm 1,5 \mu\text{m.s}^{-1}$; $P < 0,05$), mas não diferiu de ACP-PS-500 ($32,6 \pm 15,3 \mu\text{m.s}^{-1}$; $P > 0,05$). Ao final de 72 h de armazenamento hipotérmico, a VCL do tratamento ACP ($33,6 \pm 10,4 \mu\text{m.s}^{-1}$) foi significativamente superior aos tratamentos *in natura* ($0,0 \pm 0,0 \mu\text{m.s}^{-1}$), ACP-PS-0,25 ($21,7 \pm 2,9 \mu\text{m.s}^{-1}$), ACP-PS-0,50 ($18,6 \pm 1,5 \mu\text{m.s}^{-1}$) e ACP-PS-0,75 ($20,9 \pm 2,9 \mu\text{m.s}^{-1}$; $P < 0,05$). Os tratamentos diluídos em ACP com adição das diferentes concentrações de PS não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Comportamento semelhante foi observado para VSL, de tal forma que, ao final de 72 horas de resfriamento, o tratamento ACP foi significativamente superior ao tratamento *in natura* ($0,0 \pm 0,0 \mu\text{m.s}^{-1}$), ACP-PS-0,25 ($7,0 \pm 2,6 \mu\text{m.s}^{-1}$), ACP-PS-0,50 ($5,0 \pm 2,8 \mu\text{m.s}^{-1}$) e ACP-PS-0,75 ($6,1 \pm 2,6 \mu\text{m.s}^{-1}$; $P < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos com adição de PS ($P > 0,05$).

A competição espermática é uma condição característica de peixes com fertilização externa e influenciada por algumas qualificações dos espermatozoides (STOLTZ; NEFF, 2006). As velocidades espermáticas (VCL, VSL e VAP) são importantes parâmetros reprodutivos para peixes (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014), sendo correlacionadas positivamente às taxas de fertilização e ao sucesso reprodutivo (VIVEIROS *et al.*, 2010; SANCHES *et al.*, 2015). Dentre as quais, destaca-se a VCL, devido ao movimento circular contribuir para o encontro dos espermatozoides com a micrópila, favorecendo assim, a fertilização (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; KIME *et al.*, 2001).

A VSL indica a velocidade média do percurso do espermatozoide em função da linha reta, estabelecida entre os pontos inicial e final da trajetória (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014). Espermatozoides com elevado VSL apresentam trajetória regular, linear e com reduzido movimento lateral (DI CHIACCHIO *et al.*, 2017). Além disso, são apontadas correlações positivas entre VSL e a taxa de fertilização (FIGUEROA *et al.*, 2016), assim como, nas taxas de motilidade e nas velocidades espermáticas (SANCHES *et al.*, 2015; VIVEIROS *et al.*, 2010). Os resultados de VCL e VSL sugerem a ocorrência de uma interação negativa, a partir de 24 h

de armazenamento à 4 °C, entre os polissacarídeos sulfatados e o sêmen de tambaqui diluído em ACP®-104, causando interferências não favoráveis a tais parâmetros espermáticos.

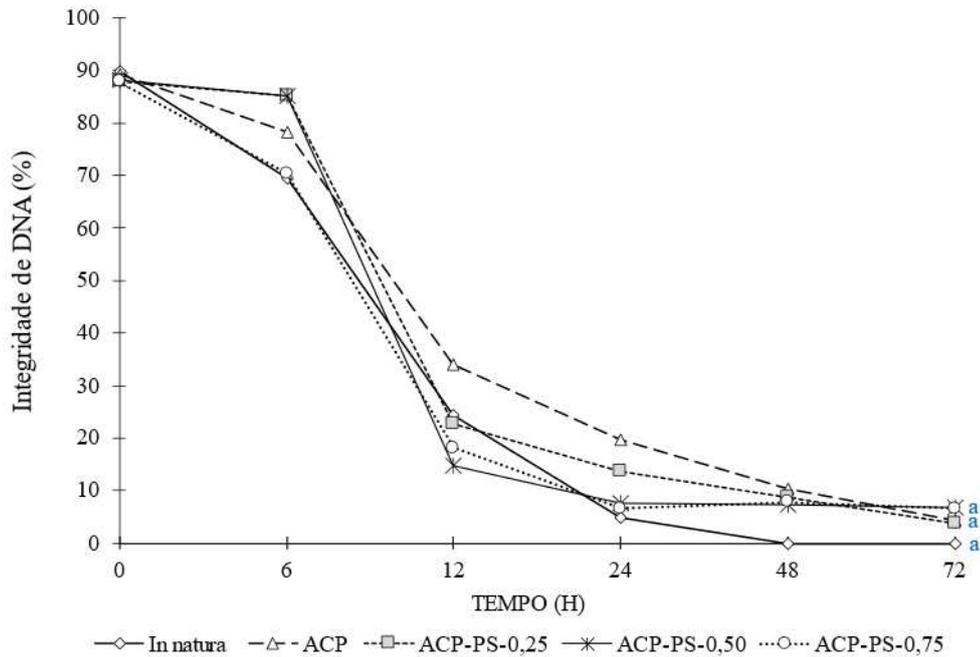
Enquanto que, para a VAP, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ACP ($22,8 \pm 8,9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e ACP-PS-0,25 ($22,8 \pm 8,9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$; $P>0,05$), ao final de 72 horas de resfriamento seminal. De tal forma que, as maiores concentrações de PS, ou seja, ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75 não diferiram entre si ($P>0,05$) e promoveram maiores reduções de VAP ($9,4 \pm 3,4$ e $10,3 \pm 2,8 \mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente).

Esses resultados sugerem uma baixa afinidade entre os espermatozoides da espécie e as maiores concentrações de PS da macroalga (para VAP) ou até mesmo um efeito negativo dessas substâncias às células espermáticas (para VCL e VSL). Outra hipótese é que a adição de PS aumentou, gradativamente, a viscosidade do meio diluidor ao decorrer do tempo de armazenamento, elevando assim, a resistência ao movimento espermático. Ao estudarem, respectivamente, a estrutura de polissacarídeos e a suplementação meio criodiluidor com PS de macroalgas verdes, Robic *et al.* (2009) e Do Nascimento *et al.* (2022) verificaram o aumento da viscosidade dos meios com a adição desses polímeros. As macroalgas marrons constituem as principais fontes de alginato, um importante polissacarídeo com grande capacidade para formação de géis e aumento da viscosidade do meio aquoso (KAIDI *et al.*, 2022; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015).

Além disso, os polissacarídeos sulfatados presentes nas macroalgas marrons, a exemplo da *A. nodosum*, são constituídos, em sua maior parte, por fucoidans e ascofilianos (USOV *et al.*, 2022), cuja solubilidade é dependente do nível de ramificações e da quantidade de grupamentos sulfato (AROKIARAJAN *et al.*, 2022). Dessa forma, novas pesquisas devem ser realizadas a fim de verificar o grau de solubilidade e os impactos da adição de PS da macroalga *A. nodosum* sobre a viscosidade do meio diluidor e suas influências sobre os parâmetros cinéticos de espermatozoides submetidos ao resfriamento seminal.

Em até seis horas de resfriamento, os valores da integridade do DNA espermático dos tratamentos ACP-PS-0,25 ($85,06 \pm 2,74\%$) e ACP-PS-0,50 ($85,12 \pm 4,39\%$) mantiveram-se próximos à 85%, sendo estatisticamente superior ao tratamento ACP ($78,37 \pm 6,65\%$) e aos tratamentos *in natura* ($69,50 \pm 9,52\%$) e ACP-PS-0,75 ($70,37 \pm 9,07\%$), ambos com valores de integridade de DNA próximos a 70% (Figura 6). Além disso, para ACP-PS-0,25 e ACP-PS-0,50, não houve diferença entre as horas zero e seis ($P>0,05$), o que sugere uma interação positiva entre as menores concentrações de polissacarídeos sulfatados e a manutenção da integridade de DNA espermática em até seis horas de resfriamento.

Figura 6 – Integridade do DNA (%) dos espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* (n = 8 pools).



In natura: sêmen não diluído sem adição de PS. ACP: Sêmen diluído em ACP[®]-104 sem adição de PS. ACP-PS-0,25, ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75: sêmen com diluído em ACP[®]-104 suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹ de PS, respectivamente. Na última hora de resfriamento (72 h), médias com letras iguais não apresentam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey (ANOVA, P<0,05).

A integridade do DNA é um fator essencial para que as células germinativas permitam a transmissão adequada da informação genética parental à progênie (FERNÁNDEZ-DÍEZ *et al.*, 2016; FIGUEROA *et al.*, 2020). A adição de compostos antioxidantes, a exemplo dos PS, é uma alternativa para neutralizar o estresse oxidativo gerado pelo emprego das técnicas de criopreservação, que tem sido associado a danos no DNA espermático de peixes, sendo uma das principais causas da fragmentação do DNA (MELLO *et al.*, 2017; OGRETMEN *et al.*, 2015; SANDOVAL-VARGAS *et al.*, 2021).

O aumento de espécies reativas de oxigênio como o superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) geram lesões estruturais na fita dupla do DNA. Nele, os principais alvos de EROs são as bases nitrogenadas, em especial a guanina e adenina, devido aos seus baixos potenciais redox. Essa reação promove o enfraquecimento da ligação entre as bases nitrogenadas na posição 8 (8-oxodG e 8-oxodA) e a unidade de ribose adjacente, o que pode gerar a perda da base oxidada, a desestabilização da estrutura e a fragmentação do DNA (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; CONTRERAS *et al.*, 2020; FIGUEROA *et al.*, 2020).

Após seis horas de armazenamento hipotérmico houve uma redução acentuada e significativa na quantidade de espermatozoides com DNA íntegro para todos os tratamentos, de tal forma que, em 12 horas após o resfriamento, a porcentagem de espermatozoides com DNA não fragmentado manteve-se abaixo de 40%. Nesse período, o tratamento ACP ($33,87 \pm 4,73\%$) apresentou a maior quantidade de células espermáticas com DNA intacto, enquanto os tratamentos com as maiores concentrações de polissacarídeos sulfatados ACP-PS-0,50 ($14,62 \pm 2,72\%$) e ACP-PS-0,75 ($18,12 \pm 2,37\%$) apresentaram os menores resultados. A partir de então, houve uma redução gradativa da integridade de DNA em todos os tratamentos ao longo do tempo. Esse comportamento foi observado até o final do período experimental, em que não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto a integridade de DNA espermático ao final de 72 horas de resfriamento ($P > 0,05$), com valores inferiores a 10%.

No entanto, é importante considerarmos um comportamento estável nos valores de integridade de DNA espermático dos tratamentos ACP-PS-0,50 ($7,56 \pm 1,08 \%$) e ACP-PS-0,75 ($6,50 \pm 0,88 \%$) a partir de 24 horas, até o final de 72 horas de resfriamento, quando os valores foram de $6,87 \pm 0,58 \%$ e $6,62 \pm 0,87 \%$, respectivamente. Não apresentando, por tanto, diferenças estatísticas entre as horas 24 (H24), 48 (H48) e 72 (H72; $P > 0,05$). Enquanto que o tratamento controle (ACP) apresentou uma perda crescente no número de espermatozoides com DNA íntegro nas horas 24 ($19,68 \pm 1,44 \%$), 48 ($10,31 \pm 0,96 \%$) e 72 ($4,37 \pm 1,46\%$), apresentando diferenças significativas em seus valores durante os três períodos de armazenamento à 4°C ($P < 0,05$).

Isso sugere que a adição das maiores concentrações de PS ($0,50$ e $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$) é capaz de manter a estabilidade da integridade do DNA espermático entre 24 e 72 horas de resfriamento seminal à 4°C . Essa hipótese pode ser justificada pelo comportamento declinante observado no tratamento controle ACP, durante esse mesmo período de armazenamento sob as mesmas condições. Acreditamos ainda, que em períodos de armazenamento hipotérmico superiores a 72 horas, os danos à integridade do DNA espermático no tratamento ACP tenderiam a 100%, enquanto que aos dos tratamentos ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75 permaneceriam constantes.

Porém, esses valores de integridade de DNA, até mesmo para o tratamento controle ACP, estão muito abaixo dos considerados ideais para fertilização de oócitos em peixes. Segundo a literatura é necessário que ao menos 90% do DNA espermático esteja íntegro (FERNÁNDEZ-DÍEZ *et al.*, 2015; PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2010). Em estudos com a truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, Pérez-Cerezales *et al.* (2010) e Fernández-Díez *et al.* (2015)

verificaram que os oócitos da espécie são capazes de reparar até 10% da fragmentação do DNA espermático durante as primeiras clivagens pós-fertilização.

Esses efeitos negativos nem sempre diminuem a funcionalidade do espermatozoide e a capacidade de fertilização, porém, podem afetar os processos celulares e moleculares pós-fertilização e gerar embriões defeituosos (FERNÁNDEZ-DÍEZ; HERRÁEZ, 2018; FIGUEROA *et al.*, 2020). A integridade da cromatina espermática desempenha um importante papel durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário. Danos à cromatina de espermatozoides demonstram ter efeitos mais relevantes no início do desenvolvimento embrionário do que durante a própria fertilização (FIGUEROA *et al.*, 2020).

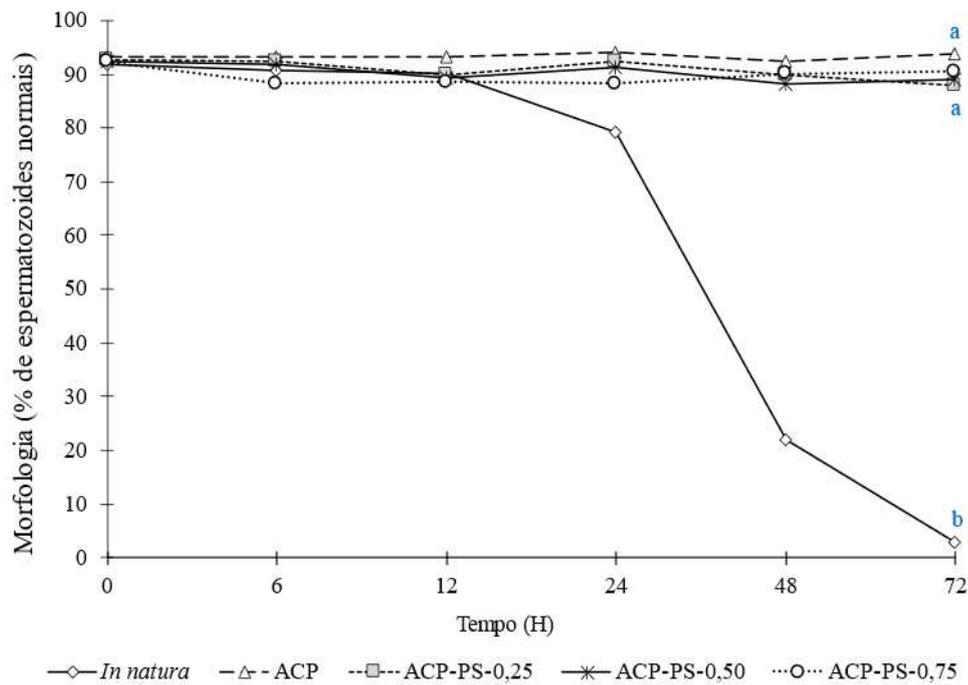
No presente trabalho, a adição de PS como agentes antioxidantes não foi capaz de promover a manutenção da integridade de DNA de células espermáticas por mais de seis horas de resfriamento à 4 °C. Essa suplementação ao meio diluidor causou um efeito negativo sobre esse parâmetro espermático, de tal forma que as maiores concentrações de PS aceleraram os processos que resultaram na diminuição da integridade de DNA dos espermatozoides. Nossos resultados corroboram com os achados por Cabrita *et al.* (2011), esses autores observaram que a suplementação com dois compostos antioxidantes (ácido ascórbico e α -tocoferol) na congelação seminal de robalo europeu, promoveu um aumento no dano ao DNA espermático, o que sugere uma potencialização do efeito oxidativo em vez da proteção contra danos. Por outro lado, um efeito oposto foi verificado por Mirzoyan *et al.* (2006), que ao suplementarem o meio de congelação do sêmen de esturjão (*Acipenser gueldenstaedti*) com ácido ascórbico, verificaram a redução de deformidades cromossômicas em embriões em desenvolvimento, que sugere a redução de danos no DNA espermático da espécie.

Com base nessas informações e nos resultados obtidos no presente trabalho, é sugerido um efeito espécie-específico que provavelmente não depende apenas do tipo de antioxidante adicionado, mas também sua concentração e interação com o meio diluidor utilizado (CABRITA *et al.*, 2011). Apesar disso, o comportamento de estabilização da integridade do DNA espermático com a adição das maiores concentrações de PS, observado a partir de 24 horas de resfriamento, frente ao grupo controle, deve ser objeto de novos estudos. Neles, deve-se verificar maiores tempos de armazenamento seminal à 4 °C, para correlacionar a manutenção dos parâmetros espermáticos durante o resfriamento a curto e médio prazo, com a adição de polissacarídeos sulfatados.

Quanto a morfologia espermática, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos suplementados ou não com polissacarídeos sulfatados, ao longo dos diferentes tempos de resfriamento seminal à 4 °C (Figura 7). Ao final de 72 horas, o tratamento

ACP apresentou $93,8 \pm 1,1\%$ de espermatozoides com morfologia normal, enquanto que os tratamentos com PS (ACP-PS-0,75; ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,25) apresentaram $90,5 \pm 4,1\%$, $88,9 \pm 4,0\%$ e $87,9 \pm 4,6\%$, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre os quatro grupos ($P > 0,05$). No entanto, no tratamento *in natura* houve uma queda significativa na qualidade morfológica dos espermatozoides.

Figura 7 – Morfologia (%) dos espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* ($n = 8$ pools).



In natura: sêmen não diluído sem adição de PS. ACP: Sêmen diluído em ACP[®]-104 sem adição de PS. ACP-PS-0,25, ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75: sêmen com diluído em ACP[®]-104 suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹ de PS, respectivamente. Na última hora de resfriamento (72 h), médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA, $P < 0,05$).

Esse resultado sugere que a suplementação do meio diluente com polissacarídeos sulfatados não interferiu sobre a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais durante o resfriamento seminal de tambaqui à 4 °C. Respostas diferentes foram encontradas por Pereira *et al.* (2020), ao obterem maiores taxas de anormalidades espermática com uso de maiores concentrações de PS (0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹) extraídos de *Caulerpa cupressoides* e *Solieria filiformis*, durante a suplementação do meio de congelação seminal de tambaqui. Isso sugere mais uma vez que os efeitos da suplementação do meio diluidor são dependentes das características e da concentração do composto suplementar adicionado, o que pode promover

uma interação espécie-específico com o sêmen utilizado (CABRITA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2020).

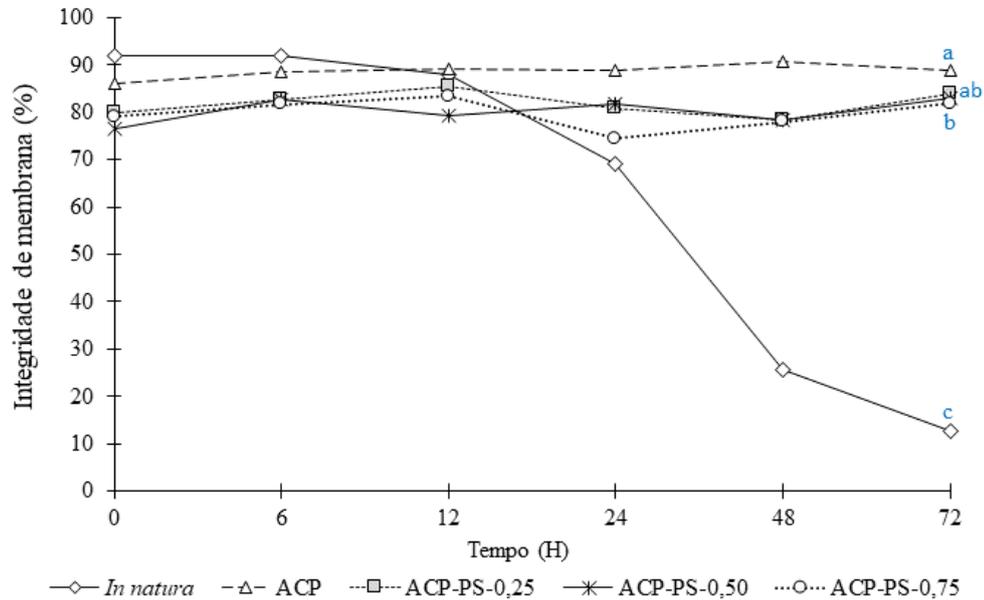
O tratamento controle *in natura*, ou seja, sem diluição, manteve o nível de espermatozoides com morfologia normal em $90,1 \pm 2,8\%$ em até 12 horas de resfriamento, sem diferença estatística entre os demais tratamentos ($P > 0,05$). Porém, após as 12 horas de resfriamento à 4 °C houve uma redução significativa na quantidade de espermatozoides normais deste tratamento, tornando-se substancialmente inferior aos demais após 24 ($79,2 \pm 6,5\%$), 48 ($22,1 \pm 14,2\%$) e 72 ($2,87 \pm 1,1$) horas ($P < 0,05$). Esse achado reforça ainda mais a necessidade do uso de um bom diluente durante o armazenamento seminal de tambaqui a curto prazo, que além de prevenir o início da ativação e motilidade espermática, fornece nutrientes e energia (ATP) aos espermatozoides, que é essencial para manter sua estrutura e viabilidade durante o armazenamento (CONTRERAS *et al.*, 2020).

Dentre os parâmetros que avaliam a integridade estrutural dos espermatozoides, a análise da morfologia espermática é essencial devido sua relação direta com a capacidade fecundante dos gametas (MILIORINI *et al.*, 2011). Estudos sugerem que as morfopatologias espermáticas têm sido associadas à infertilidade e esterilidade de machos na maioria das espécies estudadas, de modo que a estrutura do espermatozoide desempenha um papel considerável na velocidade de natação e na capacidade de ligação ao oócito, ambos os quais, influenciam decisivamente no processo de fertilização (CHENOWETH, 2005; MCDIARMID *et al.*, 2022).

Ao término do período experimental (72 horas de resfriamento), todos os tratamentos diluídos, com ou sem PS, apresentaram porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais superior a 85%. Esse valor está dentro da faixa aceitável para viabilidade da fertilização em peixes (até 50% de anormalidades; MILIORINI *et al.*, 2011). Segundo Miliorini *et al.* (2011), tal valor é justificável pela elevada relação espermatozoide: oócito, em um ambiente pequeno e controlado, exercer um efeito compensatório sobre as anormalidades espermáticas, possibilitando assim, a ocorrência da fertilização.

A integridade da membrana espermática do sêmen de tambaqui sofreu variações entre os tratamentos durante os diferentes tempos de resfriamento à 4 °C. Porém, para os tratamentos diluídos, com ou sem adição de polissacarídeos sulfatados, não houve alteração significativa na porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra ao longo de 72 horas de armazenamento à 4 °C, com manutenção de seus valores acima de 75% (Figura 8).

Figura 8 – Integridade de membrana plasmática (%) dos espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) resfriados em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum* ($n = 8$ pools).



In natura: sêmen não diluído sem adição de PS. ACP: sêmen diluído em ACP[®]-104 sem adição de ps. ACP-PS-0,25, ACP-PS-0,50 e ACP-PS-0,75: sêmen com diluído em ACP[®]-104 suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.ml⁻¹ de PS, respectivamente. na última hora de resfriamento (72 h), médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA, $P < 0,05$).

A integridade da membrana plasmática é uma importante análise utilizada como indicador de qualidade dos espermatozoides. Esse teste verifica a quantidade de células espermáticas com membrana intacta (TORRES; TIERSCH, 2016). Tal estrutura é altamente especializada e possui funções fundamentais nos distintos processos que modulam a capacidade de ligação do espermatozoide ao oócito (GAUTIER; AURICH, 2022). A técnica de criopreservação seminal causa injúrias às membranas plasmáticas dos espermatozoides (CABRITA *et al.*, 2014) e, dentre as principais estruturas afetadas estão as membranas plasmáticas (SEGOVIA *et al.*, 2000).

Devido à redução de enzimas antioxidantes citoplasmáticas durante a espermatogênese (GAUTIER; AURICH, 2022), ao desequilíbrio do sistema antioxidante natural causado pela diluição do plasma seminal (MOTTA *et al.*, 2022) e a presença de ácidos graxos poli-insaturados em sua composição, a membrana espermática torna-se mais vulnerável a peroxidação lipídica e a ação de EROs (WATHES *et al.*, 2007). O ataque oxidativo causado pelas EROs podem resultar em uma série de alterações patológicas aos espermatozoides, tais como a oxidação proteica, prejuízos à peça intermediária, deficiências mitocondriais e

fragmentação do DNA (CABRITA *et al.*, 2014; DA COSTA; STREIT JR., 2019), contribuindo assim, para a redução da viabilidade espermática e fecundidade do sêmen (AITKEN, 2020).

Ao final de 72 horas de armazenamento, não houve diferença estatística quanto a integridade da membrana espermática entre o tratamento controle ACP ($88,7 \pm 3,3\%$) e os tratamentos com as menores concentrações de PS, ou seja, ACP-PS-0,25 ($83,8 \pm 3,1\%$) e ACP-PS-0,50 ($82,7 \pm 2,8\%$). Enquanto que o tratamento com a maior concentração de PS (ACP-PS-0,75) obteve resultado significativamente inferior ao controle ($77,5 \pm 3,1\%$), mas não diferiu das demais concentrações (ACP-PS-0,25 e ACP-PS-0,50; $P > 0,05$).

Esse resultado corrobora com os obtidos por Pereira *et al.* (2020), que ao testarem concentrações semelhantes de PS de macroalgas marinhas no meio de congelação seminal de tambaqui, observaram que as maiores concentrações de PS proporcionaram menores taxas de integridade de membrana espermática. Os resultados sugerem que altas concentrações desses polímeros podem aumentar a susceptibilidade da célula espermática aos efeitos do resfriamento, diminuindo assim a viabilidade do espermatozoide.

Para o grupo controle *in natura*, a taxa de espermatozoides com membrana íntegra decresceu nos diferentes tempos de resfriamento. Os valores de integridade de membrana durante as horas 0 ($91,8 \pm 1,9\%$), 6 ($91,8 \pm 2,4\%$) e 12 ($89,2 \pm 1,6\%$) não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$). Porém, a partir de 24 horas de resfriamento houve uma significativa e acentuada elevação nas taxas de espermatozoides com membrana rompida, durante as horas 24 ($69,25 \pm 6,7\%$), 48 ($25,75 \pm 12,9\%$) e 72 ($12,6 \pm 1,7\%$; $P < 0,05$).

O estresse oxidativo é um processo inevitável no metabolismo aeróbico. A redução da temperatura é tida como um dos principais indutores dessa condição durante a criopreservação seminal em peixes (CABRITA *et al.*, 2014; FIGUEROA *et al.*, 2018; SANDOVAL-VARGAS *et al.*, 2021). A formação de EROs inicia-se com a dismutação das moléculas de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo que pode ser catalisado pela enzima superóxido dismutase. Apesar da baixa reatividade e fraca ação oxidante, o H_2O_2 possui a capacidade de penetrar facilmente nas membranas celulares (WILGUS *et al.*, 2005) e ligar-se aos íons de metais de transição, tais como o Fe^{2+} ou Cu^{2+} (CAMPO *et al.*, 2006). Por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, esses íons metálicos catalisam a formação do radical hidroxila (OH^-), uma das espécies radicalares mais reativas e de elevada contribuição para o processo de peroxidação lipídica (CAMPO *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; QI *et al.*, 2005).

Existem dois tipos de mecanismos antioxidantes contra a ação dos radicais OH, um que reduz a sua formação e outro que o elimina (PARWANI *et al.*, 2014). O efeito da produção

de OH⁻ induzida por íons metálicos pode ser mitigado pelo uso de moléculas que apresentem atividade quelante (CAMPO *et al.*, 2006). Já foi verificado que os íons de sulfato presentes em polissacarídeos podem interagir com os íons de metais de transição, tais quais os Fe²⁺ ou Cu²⁺, quelando-os e impedindo o início das reações de Fenton e de Haber-Weiss (ALBERTINI *et al.*, 2000; CAEL; WINTER; ARNOTT, 1978; CAMPO *et al.*, 2006). Já a capacidade de eliminação de OH⁻ pelos PS pode ser justificada pela dessulfatação da cadeia polimérica e, posterior substituição do grupamento sulfato pela hidroxila, tornando-o indisponível ao meio e protegendo a molécula contra o ataque oxidativo (CAMPO *et al.*, 2006; QI *et al.*, 2005). Porém, a capacidade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados é dependente dos padrões espaciais e densidade dos grupos sulfatos na cadeia (COSTA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2008), bem como, das ligações glicosídicas, peso molecular e composição de açúcares (FERREIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, qualquer alteração nesses padrões moleculares pode alterar sua ação.

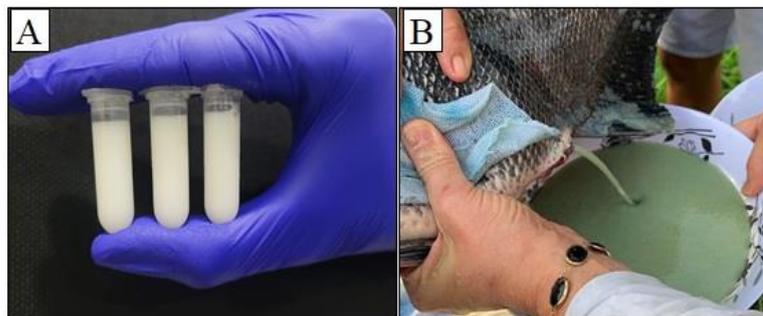
Interações eletrostáticas entre os polissacarídeos sulfatados e as glicoproteínas das membranas celulares são responsáveis pela regulação de alguns eventos fisiológicos, tais como os que ocorrem nos processos de coagulação (FONSECA *et al.*, 2008), inflamação (BRITO *et al.*, 2008) e respostas antivirais (GANDY *et al.*, 2022; WEI *et al.*, 2022). Acredita-se que essas interações também podem modular a atividade antioxidante na membrana espermática de peixes (PEREIRA *et al.*, 2020), entretanto, o mecanismo envolvido nos efeitos inibitórios dos polissacarídeos sulfatados sobre a atividade das espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana espermática e no fluido seminal ainda não é completamente compreendido.

Poucos estudos demonstraram os efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas na criopreservação seminal, dentre eles foi verificado que a adição de polissacarídeos sulfatados da macroalga vermelha *Solieria filiformis* ao meio de congelamento seminal de tambaqui, promoveu bons resultados na integridade da membrana espermática (PEREIRA *et al.*, 2020). Enquanto que a suplementação com PS das macroalgas verdes *Ulva lactuca* e *Caulerpa racemosa* não interferiu sobre esse parâmetro espermático para a mesma espécie (LOBATO *et al.*, 2022). Ao ser verificado a suplementação do meio criodiluidor com PS de uma macroalga vermelha (*Gracilaria domingensis*) e verde (*Ulva fasciata*), durante a congelamento seminal de *Prochilodus brevis*, não foram observados efeitos sobre a integridade da membrana espermática da espécie (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022). Da mesma forma, a adição de PS da macroalga vermelha *Gracilaria domigensis* ao meio diluidor do resfriamento seminal de *Prochilodus brevis* não interferiu sobre a integridade da membrana plasmática em até 96 horas de armazenamento, porém, foi observado diminuição desse parâmetro a partir de desse período (SALES *et al.*, 2023). Sugerindo, novamente, que os efeitos dos PS sobre os

parâmetros de qualidade espermática são dependentes das interações promovidas pela fonte e concentração dos polissacarídeos com o sêmen da espécie (CABRITA *et al.*, 2011) e, possivelmente, também dependente do método de conservação empregado. Até então, este é o primeiro estudo que demonstra os efeitos desses polímeros sobre a membrana espermática de tambaqui utilizando o método de resfriamento seminal à 4 °C.

Quanto ao teste de fertilização, os animais induzidos responderam positivamente aos tratamentos hormonais utilizados neste trabalho. O sêmen apresentou aspecto leitoso e coloração esbranquiçada (Figura 9A) com volume médio de $4,56 \pm 1,80$ mL por macho e concentração espermática média de $161,62 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹. Os ovócitos apresentaram coloração homogênea e verde escura (Figura 9B). Cada fêmea liberou em torno de 1.000 g de ovócitos, em uma concentração próxima a 1.500 ovócitos.g⁻¹.

Figura 9 – Aspectos de gametas masculinos e femininos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizados durante a fertilização. (A) Sêmen de três indivíduos utilizados para formação do *pool* 100% fresco. (B) Ovócitos de fêmea utilizada durante a fertilização.



Fonte: Autor.

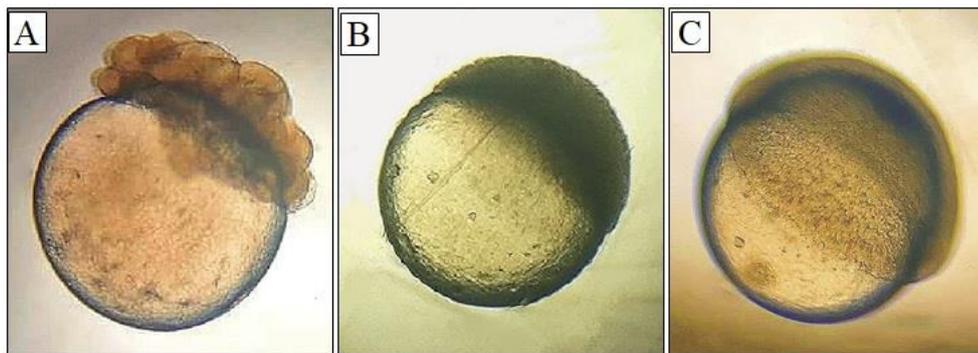
O desenvolvimento embrionário foi acompanhado até a fase de gástrula e apresentou uma sequência de eventos após a fertilização, descritos a seguir. Esse desenvolvimento iniciou-se após a fertilização com a diferenciação citoplasmática no polo animal formando o blastodisco, que corresponde ao primeiro blastômero, sob uma camada rica em vitelo no polo vegetal (LEITE *et al.*, 2013). Em sua grande maioria, os ovos de peixes são do tipo telolécito, ou seja, possuem grande quantidade de vitelo, que constitui uma reserva energética utilizada durante todo o desenvolvimento embrionário (NUNES *et al.*, 2018).

Apesar de ser rico em vitelo, o ovo de peixes possui uma pequena quantidade de citoplasma ativo, presente apenas no blastodisco, que dará origem ao embrião sobre a massa vitelínica. O blastodisco se divide em planos verticais e horizontais por meio de clivagens em direção ao polo vegetal, porém sem penetrar no vitelo, que permanece indivisível durante todo o desenvolvimento embrionário até a formação do saco vitelínico. Esse tipo de segmentação é

chamado de parcial ou meroblástica discoidal (SALMITO-VANDERLEY; SANTANA, 2010; LEITE *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2018).

Após as contínuas clivagens em planos verticais até o aparecimento de 32 blastômeros, ocorre a formação do blastoderme, que é uma camada simples de células. A partir de então, as clivagens passam a ter sentido horizontal (LEITE *et al.*, 2013; SALMITO-VANDERLEY; SANTANA, 2010). Na Figura 10A, podemos observar a divisão do polo animal de 16 a 32 blastômeros, do desenvolvimento embrionário do tambaqui no presente trabalho. A partir de então, não foi possível quantificar o número de blastômeros, visto que devido ao aumento da segmentação celular foi observado uma diminuição gradativa do tamanho dessas células. O mesmo comportamento foi observado por Marques *et al.* (2008) ao verificarem o desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e por Leite *et al.* (2013) e Almeida *et al.* (2019), ao acompanharem o desenvolvimento embrionário de tambaqui.

Figura 10 – Fases do desenvolvimento embrionário de tambaqui (*Colossoma macropomum*).



Fonte: Autor. (A) Divisão do polo animal de 16 a 32 blastômeros. (B) Fase de Blástula. (C) Fase de Gástrula.

Ao decorrer das segmentações foi observado o abaulamento do polo animal característico da fase de blástula (Figura 10B). Tal abaulamento é obtido da primeira clivagem no sentido horizontal, dividindo o embrião em duas camadas de células (SALMITO-VANDERLEY; SANTANA, 2010). As divisões continuaram a acontecer, e o polo animal foi acumulando cada vez mais células que iniciaram um movimento em direção ao polo vegetal, revestindo progressivamente a camada vitelina. Tal deslocamento é característico da fase gástrula e é conhecido por epibolia. Esse resultado corrobora com os observados por Leite *et al.* (2013) e Almeida *et al.* (2019) em estudos com o tambaqui. A fase de gástrula (Figura 10C) foi utilizada para o cálculo da taxa de fertilização.

Com relação a taxa de fertilização, após 24 horas de resfriamento seminal à 4 °C, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos ACP ($74,00 \pm 5,19$ %), ACP-PS-0,75

(68,00 ± 3,46%) e o sêmen fresco (77,66 ± 4,51%), ou seja, coletado no mesmo momento da coleta de oócitos das fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3 – Taxa de fertilização com sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) resfriado em meio diluente suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Ascophyllum nodosum*, em 24 horas de armazenamento à 4 °C ($n = 3$).

Tratamentos	Taxa de Fertilização (%)
Sêmen Fresco ¹	77,66 ± 4,51 a
ACP ²	74,00 ± 5,19 a
ACP-PS-0,25*	13,66 ± 1,53 c
ACP-PS-0,50*	54,00 ± 5,19 b
ACP-PS-0,75*	68,00 ± 3,46 a
<i>P</i> -valor	< 0,001

¹ Sêmen coletado e imediatamente adicionado aos oócitos para fertilização, sem diluição e adição de PS. ²ACP: Sêmen diluído em ACP®-104 sem adição de PS e resfriado por 24 horas à 4 °C. * Sêmen diluído em ACP®-104 suplementado com 0,25, 0,50 e 0,75 mg.mL⁻¹ de PS e resfriado por 24 horas à 4 °C. Resultados expressos em média ± desvio padrão. Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA; $P < 0,05$).

Os resultados demonstraram que a maior concentração de polissacarídeos sulfatados (0,75 mg.mL⁻¹) promoveu melhores resultados sobre as taxas de fertilização, se comparado a concentração de 0,25 mg.mL⁻¹ (13,66 ± 1,53 %) e 0,5 mg.mL⁻¹ (54,00 ± 5,19%), sendo significativamente superior a elas ($P < 0,05$). Além disso, verifica-se que com o aumento da concentração de polissacarídeos, ocorreu, também, uma elevação progressiva das taxas de fertilização.

Apesar dos resultados negativos sobre a cinética e integridade do DNA espermático do sêmen de tambaqui pós-resfriado, a maior concentração de polissacarídeos sulfatados da macroalga *A. nodosum* não promoveu efeito negativo sobre as taxas de fertilização, uma vez que não diferiu do tratamento controle ACP. Entretanto, a melhoria gradual desse parâmetro com o aumento da concentração do polímero, sugere que concentrações superiores a 0,75 mg.mL⁻¹ podem proporcionar melhoras sobre esse índice. Segundo Pedreira *et al.* (2022) e Figueroa *et al.* (2020), a fragmentação do DNA espermático causada pelas técnicas de preservação seminal nem sempre está associada a perda de motilidade ou diminuição na fertilidade, porém, podem causar danos celulares que podem afetar o período pós-fertilização ou desenvolvimento embrionário.

Tal fato foi observado por Riesco *et al.* (2017), que ao estudarem o sêmen criopreservado de linguado (*Solea senegalensis*) verificaram danos no DNA espermático, prejudicando a expressão do gene HSP70 que está relacionado ao desenvolvimento embrionário. Dessa forma, é sugerido que as taxas de fertilização não foram afetadas pelas concentrações de polissacarídeos sulfatados, pois os danos observados no DNA espermático podem ter ocorrido em locais do genoma que não se relacionam a genes envolvidos durante a fertilização.

Neste trabalho, os polissacarídeos sulfatados extraídos de *A. nodosum* foram testados em observância ao seu potencial efeito antioxidante sobre o meio espermático, durante o resfriamento seminal de *C. macropomum*. A suplementação dos meios de conservação seminal de peixes com esses polímeros naturais pode ser uma alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos. Portanto, este foi o primeiro estudo a analisar os efeitos da suplementação de PS, extraídos de uma macroalga de clima temperado, ao meio diluidor no resfriamento seminal de *C. macropomum*, uma espécie de peixe neotropical.

A adição de PS ao meio diluidor acelerou a ocorrência de efeitos adversos a integridade do DNA e parâmetros cinéticos (Motilidade total, VCL, VSL e VAP) dos espermatozoides, mas não teve influência sobre a integridade de membrada e morfologia espermática. Para fomentar efeitos positivos ao meio seminal, os compostos antioxidantes devem promover uma boa interação com o sêmen e o próprio diluidor. Entretanto, essas interações bioquímicas dos PS extraídos de macroalgas marinhas são dependentes de características intrínsecas desses polímeros, que são influenciadas pela espécie e região anatômica do tecido usado para extração, localização geográfica de coleta da amostra, época da colheita e até mesmo, o procedimento de extração (YUAN; MACQUARRIE, 2015).

Além disso, polissacarídeos sulfatados extraídos de outras espécies de macroalgas podem ser testados, aumentando assim, o grau de conhecimento sobre essas moléculas e validando a aplicabilidade desses compostos para as técnicas de conservação seminal de *Colossoma macropomum*.

7 CONCLUSÃO

A suplementação do meio de resfriamento seminal de tambaqui com polissacarídeos sulfatados de *A. nodosum* não é capaz de manter a integridade do DNA e a cinética espermática ao longo de 72 h de armazenamento à 4 °C. Contudo, não apresenta efeitos negativos sobre a integridade da membrana e na morfologia dos espermatozoides da espécie. Além disso, é possível concluir que a adição de 0,75 mg.mL⁻¹ de PS promove melhorias sobre a taxa de fertilização em até 24 horas de resfriamento seminal de tambaqui, sendo portanto, recomendado sua adição para manutenção da capacidade fecundante dos espermatozoides da espécie. Assim, a adição de polissacarídeos sulfatados ao meio de resfriamento de células espermáticas deve ser mais estudada, para conhecimento de seus efeitos inter e intraespecíficos e aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação seminal de peixes. Ademais, podemos concluir que para a manutenção das células espermáticas de *C. macropomum* durante o resfriamento seminal, se faz necessário o uso de bons diluentes, sendo o ACP®-104 indicado para esta finalidade.

REFERÊNCIAS

- ABEYRATHNE, E.D.N.S.; NAM, K.; HUANG, X.; AHN, D.U. Plant-and animal-based antioxidants' structure, efficacy, mechanisms, and applications: A review. **Antioxidants**, v.11, n.5, p.1025, 2022.
- AHMADI, S.; BASHIRI, R.; GHADIRI-ANARI, A.; NADJARZADEH, A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. **International journal of reproductive biomedicine**, v.14, n.12, p.729, 2016.
- AITKEN, R. J. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Reproduction**, v. 159, n. 4, p. R189-R201, 2020.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular reproduction and development**, v. 84, n. 10, p. 1039-1052, 2017.
- AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 111, 2020.
- AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. **Journal of andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096-1106, 2012.
- ALBERTINI, R.; PASSI, A.; ABUJA, P. M.; DE LUCA, G. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation. **International journal of molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 129-165, 2000.
- ALMEIDA, C. A. L.; VIEIRA, J. S.; ZANCANELA, V. T.; DEL VESCO, A. P.; OLIVEIRA, J. W. S.; RODRIGUES, P. G.; BRITO, C. O. Desenvolvimento embrionário e o efeito de diferentes dietas no desempenho de pós-larvas de tambaqui. **Interciencia**, v. 44, n. 11, p. 637-643, 2019.
- ANAND, N.; RACHEL, D.; THANGARAJU, N.; ANANTHARAMAN, P. Potential of marine algae (*sea weeds*) as source of medicinally important compounds. **Plant Genetic Resources**, v. 14, n. 4, p. 303-313, 2016.
- ARAÚJO-LIMA C. A. R. M.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui**: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. 1. ed. Brasília: CNPq, 1998. 198 p.
- AROKIARAJAN, M. S.; THIRUNAVUKKARASU, R.; JOSEPH, J.; EKATERINA, O.; ARUNI, W. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, p. 870-881, 2022.
- AROUCHA, E. M. M; VIANNI, R. Determinação de ácido ascórbico na água de coco (*Cocos nucifera*) por cromatografia líquida e pelo método titulométrico. **Revista Ceres**, v. 49, n. 283, p. 245-251, 2002.

BAKER, M. A.; AITKEN, R. J. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 216, n. 1-2, p. 47-54, 2004.

BEZERRA NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) Howe: Análise de metodologias de precipitação. **Rev. Bras. Enga. Pesca**, v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008.

BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, S. B.; POURKAZEMI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v. 236, n. 1-4, p. 1-9, 2004.

BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 176-177, 1950.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Chilled storage of sperm and eggs. In: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, P. (eds). **CRC Press**. p. 219-235, 2009.

BRITO, A. S.; ARIMATÉIA, D. S.; SOUZA, L. R.; LIMA, M. A.; SANTOS, V. O.; MEDEIROS, V. P.; CHAVANTE, S. F. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 21, p. 9588-9595, 2008.

CABRITA, E.; MA, S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.; DINIS, M. T. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal reproduction science**, v. 125, n. 1-4, 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.

CAEL, J. J.; WINTER, W. T.; ARNOTT, S. Calcium chondroitin 4-sulfate: molecular conformation and organization of polysaccharide chains in a proteoglycan. **Journal of Molecular Biology**, v. 125, n. 1, p. 21-42, 1978.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; SALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 36, p. 135-153, 2005.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A. M.; CALATRONI, A. Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1311-1320, 2006.

CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CARVALHO, M. A. M.; LINHARES, F. R. A.; NUNES, J. F.; DE MELO-SALGUEIRO, C. C.; DA COSTA, R. B.; DE OLIVEIRA-SALES, R. Água de coco como diluente para o sêmen de peixes de água doce de fertilização externa. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 4, p. 203-222, 2014.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, p. 457–468, 2005.

COELHO, G. C. Z.; ARASHIRO, D. R.; DISSELLI, T.; PEREIRA-SANTOS, M.; MIRALÓPEZ, T. M.; MONZANI, P. S.; YASUI, G. S. Developmental stages, incubation temperature, and in vivo traceability of primordial germ cell in an important aquaculture species *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 535, p. 736381, 2021.

CONTRERAS, P.; DUMORNÉ, K.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; MERINO, O.; FIGUEROA, E.; FARIAS, J. G.; RISOPATRON, J. Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1373-1389, 2020.

CONTRERAS, P.; ULLOA, P.; MERINO, O.; VALDEBENITO, I.; FIGUEROA, E.; FARIAS, J.; RISOPATRÓN, J. Effect of short-term storage on sperm function in Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) sperm. **Aquaculture**, v. 481, p. 58-63, 2017.

CORNISH, M. L.; GARBARY, D. J. Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. **Algae**, v. 4, n. 25, p. 155-171, 2010.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

DA COSTA, B. B.; STREIT JR., D. P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 2, p. 93-109, 2019.

DE ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; PINHEIRO, R. R. R.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; SALES, Y. S.; DO NASCIMENTO, R. V.; NUNES, L. T.; PEREIRA, V. A.; MONTENEGRO, A. R.; MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Sperm vitrification of *Prochilodus brevis* using Powder Coconut Water (ACP-104) in association with different cryoprotectant concentrations. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 11, p. 4565-4574, 2020.

DE OLIVEIRA, F. D. C. E.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; TORRES, T. M.; LEITE-CASTRO, L. V.; SALGUEIRO, C. C. D. M.; LINHARES, F. R. A.; CARVALHO, M. A. M.; SALES, Y. S.; NUNES, J. F. Powdered coconut water with cryoprotectant can be used for cooling and future freezing of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 38, n. 3, p. 275-284, 2022.

DEGRAAF J. D.; BERLINSKY D. L. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. **Aquaculture** v. 234, p. 527– 540, 2004.

DENIAUD-BOUËT, E.; HARDOUIN, K.; POTIN, P.; KLOAREG, B.; HERVÉ, C. A review about brown algal cell walls and fucose containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 395-408, 2017.

DI CHIACCHIO, I. M.; ALMEIDA, I. L.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. **Theriogenology**, v. 90, p. 284-288, 2017.

DILAURO, M. N.; KRISE, W. F.; HENDRIX, M. A.; BAKER, S. E. Short term storage of Atlantic sturgeon sperm. **The progressive Fish Culturist**, v. 56, n. 1, p. 143-144, 1994.

DO NASCIMENTO, R. V.; LEITE-CASTRO, L. V.; MONTENEGRO, A. R.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S.; LOPES, J. T.; DE ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Influência do tempo de resfriamento e soluções diluentes sobre a congelabilidade do sêmen de *Prochilodus brevis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-9, 2017.

DO NASCIMENTO, R. V.; DE ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; PEREIRA, V. A.; TORRES, T. M.; NUNES, L. T.; SALES, Y. S.; BRITO, B. F.; MOREIRA, F. H. G.; ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; MONTENEGRO, A. R.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Sulfated polysaccharides from seaweed as a supplement to *Prochilodus brevis* sperm freezing medium. **Cryoletters**, v. 43, n. 2, p. 110-119, 2022.

ELOKIL, A. A.; BHUIYAN, A. A.; LIU, H. Z.; HUSSEIN, M. N.; AHMED, H. I.; AZMAL, S. A.; YANG, L.; LI, S. The capability of L-carnitine-mediated antioxidant on cock during aging: evidence for the improved semen quality and enhanced testicular expressions of GnRH1, GnRHR, and melatonin receptors MT 1/2. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 4172-4181, 2019.

EOM, S. H.; KIM, Y. M.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, p. 3251-3255, 2012.

FARIAS, W. R.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 29299-29307, 2000.

FÉLIX, F.; OLIVEIRA, C. C. V.; CABRITA, E. Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 36, 2021.

FERNANDEZ, J. L.; MURIEL, L.; GOYANES, V.; SEGRELLER, E.; GONSÁLVEZ, J.; ENCISO, M.; LAFOMBROISE, M.; DE JONGE, C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 4, p. 883-842, 2005.

FERNÁNDEZ-DÍEZ, C.; GONZÁLEZ-ROJO, S.; LOMBÓ, M.; HERRÁEZ, M. P. Impact of sperm DNA damage and oocyte-repairing capacity on trout development. **Reproduction**, v. 152, n. 1, p. 57-67, 2016.

FERNANDEZ-DIEZ, C.; GONZALEZ-ROJO, S.; MONTFORT, J.; LE-CAM, A.; BOBE, J.; ROBLES, V.; PEREZ-CEREZALES, S.; HERRAEZ, M.P. Inhibition of zygotic DNA repair: transcriptome analysis of the offspring in trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Reproduction**, v. 149, n. 1, p. 101-111, 2015.

FERNÁNDEZ-DÍEZ, C.; HERRÁEZ, M. P. Changes in transcriptomic profile of trout larvae obtained with frozen sperm. **Aquaculture**, v. 492, p. 306-320, 2018.

FERREIRA, I. C.; HELENO, S. A.; REIS, F. S.; STOJKOVIC, D.; QUEIROZ, M. J. R.; VASCONCELOS, M. H.; SOKOVIC, M. Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. **Phytochemistry**, v. 114, p. 38-55, 2015.

FIGUEROA, E.; LEE-ESTÉVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; FARIÁS, J. G.; ROMERO, J. Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 382-391, 2020.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; MERINO, O.; UBILLA, A.; RISOPATRÓN, J.; FARIAS, J. G. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 3, p. 1537-1550, 2016.

FIGUEROA, E.; FARIAS, J. G.; LEE-ESTEVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; RISOPATRÓN, J.; MAGNOTTI, C.; OLIVEIRA, R. P. S. Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 493, p. 1-8, 2018.

FLORES, E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, n. 6, p. 784-797, 2009.

FONSECA, R. J.; OLIVEIRA, S. N. M.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M.; MOURÃO, P. A. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 03, p. 539-545, 2008.

FREITAS, M.V.; LIRA, L.V.G.; ARIEDE, R.B.; AGUDELO, J.F.G.; OLIVEIRA NETO, R.R.; DE BORGES, C.H.S.; MASTROCHIRICO-FILHO, V. A.; GARCIA NETO, B.F.; CARVALHEIRO, R.; HASHIMOTO, D.T. Genotype by environment interaction and genetic parameters for growth traits in the Neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 530, p. 735933, 2021.

GANDY, L. A.; CANNING, A. J., LOU, H., XIA, K., HE, P., SU, G., CAIRNS, T.; LIU, J.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; COHEN, G.; WANG, C. Molecular determinants of the interaction between HSV-1 glycoprotein D and heparan sulfate. **Frontiers in Molecular Biosciences**, p. 1241, 2022.

GARCIA, R. R. F.; VASCONCELOS, A. C. N.; POVH, J. A.; OBERST, E. R.; ELOY, L. R.; STREIT JUNIOR, D. P. Different extenders solutions for tambaqui semen cooling. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 780-784, 2016.

GAUTIER, C.; AURICH, C. “Fine feathers make fine birds”–The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106884, 2022.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n.6, p.315-326, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5. Ed. USA: Oxford university press, 2015. 856 p.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. 1. Ed. Ottawa: IDRC, 1993. 144p.

HEMMINGSON, J. A.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; THOMPSON, K. Structure and antiviral activity of the galacto fucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 185-193, 2006.

HERMUND, D. B. Antioxidant properties of seaweed-derived substances. In: Bioactive seaweeds for food applications. **Academic Press**, p. 201-221, 2018.

HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E.; VALLADÃO, G. M. R.; ZAMINHAN-HASSEMER, M.; HASHIMOTO, D. T.; DAIRIKI, J. K.; TAKAHASHI, L. S.; ALBERGARIA, F. C.; GOMES, M. E. S.; VENTURIERI, R. L. L.; MOREIRA, R. G.; CYRINO, J. E. P. The farming and husbandry of *Collossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 2, p. 993-1027, 2022.

HU, T.; LIU, D.; CHEN, Y.; WU, J.; WANG, S. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 193-198, 2010.

HUANG, L.; SHEN, M.; MORRIS, G. A.; XIE, J. Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 1-11, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Produção Pecuária municipal**, Rio de Janeiro, v. 50, p. 1-12, 2023.

JENKINS-KEERAN, K.; SCHREUDERS, P.; EDWARDS, K.; WOODS III, L. C. The effects of oxygen on the short-term storage of striped bass semen. **North American Journal of Aquaculture**, v. 63, n. 3, p. 238-241, 2001.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.

JRIDI, M.; NASRI, R.; MARZOUGUI, Z.; ABDELHEDI, O.; HAMDY, M.; NASRI, M. Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1221-1228, 2019.

KAIDI, S.; BENTISS, F.; JAMA, C.; KHAYA, K.; BELATTMANIA, Z.; REANI, A.; SABOUR, B. Isolation and Structural Characterization of Alginates from the Kelp Species *Laminaria ochroleuca* and *Saccorhiza polyschides* from the Atlantic Coast of Morocco. **Colloids and Interfaces**, v. 6, n. 4, p. 51, 2022.

KEFER, J. C.; AGARWAL, A.; SABANEH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International journal of Urology**, v. 16, n. 5, p. 449-457, 2009.

KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W.; MCALLISTER, B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E.; OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 425-433, 2001.

KONZEN-FREITAS, A. R.; ABREU, J. G.; ABREU, J. S.; QUEIROZ DANTAS, V. L.; CORRÊA-FILHO, R. A. C.; POVH, J. A. Tambaqui females (*Colossoma macropomum*) spawn after hormonal induction with buserelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v. 221, p. 106594, 2020.

KUTLUYER, F.; KAYIM, M.; ÖĞRETMEN, F.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 462-466, 2014.

LAGUNA, L. E. Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (*Cocus nucifera*) coco da praia e anão. 1996. 532 f. Monografia (Especialização) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1996.

LEITE, L. V.; MELO, M. A. P.; OLIVEIRA, F. C. E.; PINHEIRO, J. P. S.; CAMPELLO, C. C.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 421-429, 2013.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; DE ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; DA COSTA, E. V. Criopreservação do sêmen bovino. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, 2011.

LI, P.; XI, M. D.; DU, H.; QIAO, X. M.; LIU, Z. G.; WEI, Q. W. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 2, p. 287-295, 2018.

LIMA, J. F.; MONTAGNER, D.; DUARTE, S. S.; YOSHIOKA, E. T. O.; DIAS, M. K. R.; TAVARES-DIAS, M. Recirculating system using biological aerated filters on tambaqui fingerling farming. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 54, 2019.

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

LIU, J. J.; LEE, J. W.; YUN, E. J.; JUNG, S. M.; SEO, J. H.; JIN, Y. S. L-Fucose production by engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 904-911, 2019.

LOBATO, J. S.; PEREIRA, V. A.; MOREIRA, F. H. G.; BARBOSA, M. S. A.; RODRIGUES, J. A. G.; ARAUJO, I. W. F.; CÂNDIDO-SOBRINHO, S. A.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Supplementation of cryodiluent medium with sulfated polysaccharides from green seaweeds in the freezing of *Colossoma macropomum* semen. **SEMINA-CIENCIAS AGRARIAS**, v. 43, n. 6, p. 2769-2784, 2022.

LUO, D.; ZHAN, Q.; WANG, H.; CUI, Y.; SUN, Z.; YANG, J. Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 617, p. 33-40, 2009.

MARQUES, C.; NAKAGHI, L. S. O.; FAUSTINO, F.; GANECO, L. N.; SENHORINI, J. A. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. **Zygote**, v. 16, p. 333-342, 2008.

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Estocagem refrigerada de esperma de seis peixes neotropicais Characiformes. **Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia**, v. 47, p. 799-804, 2004.

- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GÓMEZ-ROMANO, F.; BLANCO, G.; SÁNCHEZ, J.A.; HERRAÁEZ, M.P. Cryobanking as tools for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potencial. **Theriogenology**, v. 71, p. 594-604, 2009.
- MASTROCHIRICO-FILHO, V. A.; PAZO, F. D.; HATA, M. E.; VILLANOVA, G. V.; FORESTI, F.; VERA, M.; MARTÍNEZ, P.; PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T. Assessing genetic diversity for a pre-breeding program in *Piaractus mesopotamicus* by snps and srs. **Genes**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2019.
- MCDIARMID, C. S.; HURLEY, L. L.; LE MESURIER, M.; BLUNSDEN, A. C.; GRIFFITH, S. C. The impact of diet quality on the velocity, morphology and normality of sperm in the zebra finch *Taeniopygia guttata*. **Journal of Experimental Biology**, v. 225, n. 9, p.243715, 2022.
- MELLO, F.; GARCIA, J. S.; GODOY, L. C.; DEPINCE, A.; LABBÉ, C.; STREIT JR, D. P. The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 245, p. 94-101, 2017.
- MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES-JR, J. B. Avaliação espermiática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). **Acta Amazônica**, v. 38, n. 2, p. 365–368, 2008.
- 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.
- MIRZOYAN, A. V.; NEBESIKHINA, N. A.; VOYNOVA, N. V.; CHISTYAKOV, V. A. Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). **International Journal of Refrigeration**, v. 29, n. 3, p. 374-378, 2006.
- MORAIS, I. D. S.; O'SULLIVAN, F. D. A. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 81-93, 2017.
- MORITA, M.; NAKAJIMA, A.; TAKEMURA, A.; OKUNO, M. Involvement of redox-and phosphorylation-dependent pathways in osmotic adaptation in sperm cells of euryhaline tilapia. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 12, p. 2096-2104, 2011.
- MOTTA, N. C.; EGGER, R. C.; MONTEIRO, K. S.; DE OLIVEIRA, A. V.; MURGAS, L. D. S. Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, v. 179, p. 14-21, 2022.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 17-26, 1999.

NUNES, L. T.; OLIVEIRA, M. S.; LOPES, J. T.; DE SOUZA, M. E. M.; PINHEIRO, R. R. R.; CAMPELLO, C. C.; VANDERLEY, C. S. B. S. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1643-1653, 2016.

NUNES, L. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; REIS, F. Y. T.; NERES, R. W. P.; DA SILVA, S. Q. Reproduction of Brazilian reofilic fish: artificial fertilization and water quality. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 42, n. 1, p. 15-21, 2018.

ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B. E.; KUTLUYER, F.; KAYIM, M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1548-1552, 2015.

OLIVEIRA, A. M.; VAL, A. L. Effects of climate scenarios on the growth and physiology of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) (*Characiformes: Serrasalmidae*). **Hydrobiologia**, v. 789, p. 167–178, 2017.

OLSEN, J. L.; ZECHMAN, F. W.; HOARAU, G.; COYER, J. A.; STAM, W. T.; VALERO, M.; ÅBERG, P. The phylogeographic architecture of the furoid seaweed *Ascophyllum nodosum*: an intertidal ‘marine tree’ and survivor of more than one glacial–interglacial cycle. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 5, p. 842-856, 2010.

PAES, M. C. F.; SILVA, R. C.; NASCIMENTO, N. F.; VALENTIN, F. N.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O. Hatching, survival and deformities of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos subjected to different cooling protocols. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 451-456, 2014.

PARK, C.; CHAPMAN, F. A. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. **North American Journal of Aquaculture**, v. 67, n. 1, p. 52-57, 2005.

PARWANI, L.; BHATNAGAR, M.; BHATNAGAR, A.; SHARMA, V. Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing. **Journal of applied phycology**, v. 26, p. 1473-1482, 2014.

PEDREIRA, A. C. O.; MALACARNE, A. M.; DALMASO, A. C. S.; CARVALHO, K. I. F. S.; CHAGAS, T. V.; DA SILVA GAMBETTA, M. I. R.; BOMBARDELLI, R. A. L-carnitine solution used on *Rhamdia quelen* thawed sperm activation boosts sperm movement, maintains larval quality, and permits to optimize the sperm use. **Animal Reproduction Science**, v. 245, p. 107054, 2022.

PEREIRA, L.; MORRISON, L.; SHUKLA, P. S.; CRITCHLEY, A. T. A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 3561-3584, 2020.

PEREIRA, V. A.; ALENCAR, D. B.; ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; LOPES, J. T.; NUNES, L. T.; FERREIRA, Y. M.; LOBATO, J. S.; MONTENEGRO, A. R.; VANDERLEY, C. S. B. S. Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalmidae) sêmen. **Aquaculture**, v. 528, p. 735553, 2020.

PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; BEIRÃO, J.; HERRÁEZ, M. P. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 989-997, 2010.

PIRES, L.B.; SANCHES, E.A.; ROMAGOSA, E.; CORRÊA FILHO, R.A.C.; NASS, R.A.R.; LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after room-temperature and cold storage. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n. 3, p. 747-753, 2019.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; IORDACHE, F.; STANCA, L.; PREDOI, G.; SERBAN, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112891, 2021.

PRADHAN, B.; PATRA, S.; NAYAK, R.; BEHERA, C.; DASH, S. R.; NAYAK, S.; JENA, M. Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4263-4278, 2020.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, H.; XI, N.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **Int. Jour. Biol. Macromol.**, v. 37, p. 195-199, 2005.

RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMDAR, K. C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, 1997.

RIESCO, M. F.; OLIVEIRA, C.; SOARES, F.; GAVAIA, P. J.; DINIS, M. T.; CABRITA, E. *Solea senegalensis* sperm cryopreservation: New insights on sperm quality. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0186542, 2017.

ROBIC, A.; GAILLARD, C.; SASSI, J. F.; LERAT, Y.; LAHAYE, M. Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 91, n. 8, p. 652-664, 2009.

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 82-87, 2004.

RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; DOS SANTOS, V. R. V. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2013. 440 p.

RONDON, R. M. M.; RONDON, F. C. M.; NUNES, J. F.; ALENCAR, A. A.; SOUSA, F. M.; CARVALHO, M. A. M. Uso da água de coco em pó (ACP[®]) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 848-854, 2008.

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, n. 3, p. 751-769, 2001.

SAAD, A.; BILLARD, R.; THERON, M. C.; HOLLEBECQ, M. G. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. **Aquaculture**, v. 71, n. 1-2, p. 133-150, 1988.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. Espécies nativas de peixes impulsionam o desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Acta Fish. Aquat. Res.**, v. 5, p. 1-9, 2017.

SALES, Y. S.; LOBATO, J. S.; VIEIRA, C. T. N. S.; FERREIRA, Y. M.; APOLIANO, M. L. D. S.; NASCIMENTO, R. V. D.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Supplementation of Sulfate Polysaccharides in the Seminal Cooling Medium of Common Curimatã (*Prochilodus Brevis*). **Cryoletters**, v. 44, n. 4, p. 208-218, 2023.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; PINHEIRO, J. P. S.; DE ALMEIDA, P. S.; LOPES, J. T.; LEITE, L. V. Methodologies for cryopreservation and mechanisms of sperm evaluation in characiformes fish. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 343-350, 2014.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; SANTANA, I. C. H. **Histologia e Embriologia Animal Comparada. Desenvolvimento de peixes**. 1 ed. Fortaleza: RDS, 2010.

SANCHES, E. A.; OKAWARA, R. Y.; CANEPPELE, D.; TOLEDO, C. P. R.; BOMBARDELLI, R. A.; ROMAGOSA, E. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112 h of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 79-88, 2015.

SANDOVAL-VARGAS, L.; SILVA, J. M.; RISOPATRON, G. J.; VILLALOBOS, E. F.; CABRITA, E.; VALDEBENITO, I. I. Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 365-387, 2021.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J.A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. 2. ed. Manaus: INPA, 2009. 144 p.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, v. 17, n. 6, p. 707-739, 1980.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. Tiersch Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, v. 53, p. 1489-1499, 2000.

SHALIUTINA, A.; HULAK, M.; GAZO, I.; LINHARTOVA, P.; LINHART, O. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. **Animal reproduction science**, v. 139, n. 1-4, p. 127-135, 2013.

SHAZADA, N. E.; ALAVI, S. M. H.; SIDDIQUE, M. A. M.; CHENG, Y.; ZHANG, S.; RODINA, M.; LINHART, O. Short-term storage of sperm in common carp from laboratory research to commercial production—A review. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-16, 2023.

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SANTOS, E. A. A.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v. 76, p. 1084-1089, 2011.

SOUSA, W. M.; SILVA, R. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E.; FREITAS, A. L. P. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate polymers**, v. 152, p. 140-148, 2016.

SOUZA, F. N.; MARTINS, E. D. F. F.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; ABREU, J. S.; PIRES, L. B.; STREIT JR, D. P.; LOPERA-BARRETO, N. M.; POVH, J. A. Ovopel[®] and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Collossoma macropomum* females. **Animal reproduction science**, v. 195, p. 53-57, 2018.

STOIA, M.; OANCEA, S. Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 638, 2022.

STOLTZ, J. A.; NEFF, B. D. Sperm competition in a fish with external fertilization: the contribution of sperm number, speed and length. **Journal of evolutionary biology**, v. 19, n. 6, p. 1873-1881, 2006.

STRASSBURGER, E. **Tratado de Botánica**. 8. ed. Barcelona: Omega, 1994. 1088 p.

THOMES, P.; RAJENDRAN, M.; PASANBAN, B.; RENGASAMY, R. Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* against isoproterenol induced myocardial infraction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 52-57, 2010.

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. 47, n. 4, p. 407-411, 2015.

ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; CONTRERAS, P.; DUMORNÉ, K.; LEE-ESTEVEZ, M.; DÍAZ, R.; FIGUEROA, E.; FARIAS, J. G. Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) spermatozoa quality after storage at 4 °C in Cortland medium. **Animal Reproduction Science**, v. 197, p. 117-125, 2018.

USOV, A. I.; BILAN, M. I.; USTYUZHANINA, N. E.; NIFANTIEV, N. E. Fucoidans of Brown Algae: Comparison of Sulfated Polysaccharides from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. **Marine Drugs**, v. 20, n. 10, p. 638, 2022.

VAL, A. L.; OLIVEIRA, A. M. *Colossoma macropomum* - A tropical fish model for biology and aquaculture. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 335, n. 9-10, p. 761-770, 2021.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L. D. A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Rev. Bras. Inov. Tecnol. Saúde**, v. 5, n. 3, p. 2236-1103, 2015.

VIEIRA, E. F.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier (1816), (Teleostei, Serrasalmidae), no baixo amazonas, BRASIL. **Acta amazona.**, v. 29, p. 625-638, 1999.

VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) (*Characiformes: Characidae*) in Central Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 4, p. 637-652, 1999.

VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 551-556, 2010.

VIVEIROS, A. T.; ISAÚ, Z. A.; FIGUEIREDO, H. C.; LEITE, M. A.; MARIA, A. N. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, p. 57-65, 2010.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International journal of biological macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.

- WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; SONG, H.; LI, P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 6-12, 2010.
- WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.
- WEI, Q.; FU, G.; WANG, K.; YANG, Q.; ZHAO, J.; WANG, Y.; JI, K.; SONG, S. Advances in research on antiviral activities of sulfated polysaccharides from seaweeds. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 581, 2022.
- WILGUS, T. A.; BERGDALL, V. K.; DIPIETROL, L. A.; OBERYSZYN, A. M. Hydrogen peroxide disrupts scarless fetal wound repair. **Wound Repair Regen**, v. 13, p. 513–519, 2005.
- WOYNÁROVICH, A.; VAN-ANROOY, R. Field Guide to the Culture of Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Cuvier, 1816. **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper**, n. 624, p. 1-121, 2019.
- WOYNAROVICH, E. **Tambaqui e pirapitinga**: propagação artificial e criação de alevinos. 3. Ed. Brasília: Codevasf, 1986, 68 p.
- XIE, J. H.; WANG, Z. J.; SHEN, M. Y.; NIE, S. P.; GONG, B.; LI, H. S.; XIE, M. Y. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 7-15, 2016.
- YANG, B.; YU, G.; ZHAO, X.; REN, W.; JIAO, G.; FANG, L.; WANG, Y.; DU, G.; TILLER, C.; GIROUARD, G.; BARROW, C. J.; EWART, H. S.; ZHANG, J. Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis*. **Food Chem**, v. 124, p. 50-57, 2011.
- YUAN, Y.; MACQUARRIE, D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. **Carbohydrate polymers**, v. 129, p. 101-107, 2015.
- ZHAN-FENG, L. I. U.; HAN-WEN, S. U. N. Progress of the Research on Chemically Modifications of Polysaccharide. **Journal of Hebei University (Natural Science Edition)**, v. 25, n. 1, p. 104, 2005.
- ZHONG, Q. W.; ZHOU, T. S.; QIU, W. H.; WANG, Y. K.; XU, Q. L.; KE, S. Z.; WANG, S. J.; JIN, W. H.; CHEN, J. W.; ZHANG, H. W.; WEI, B.; WANG, H. Characterization and hypoglycemic effects of sulfated polysaccharides derived from brown seaweed *Undaria pinnatifida*. **Food Chemistry**, v. 341, p. 128148, 2021.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; VILELLA, S. Role of protein phosphorylation/dephosphorylation in fish sperm motility activation: state of the art and perspectives. **Aquaculture**, v. 472, p. 73-80, 2017.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, v. 197, p. 99-136, 2001.

ZOROFCHIAN-MOGHADAMTOUSI, S.; KARIMIAN, H.; KHANABDALI, R.; RAZAVI, M.; FIROOZINIA, M.; ZANDI, K.; ABDUL, K. H. Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2014.

ZORZETTO, M. F.; MARTIN, I.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; ZOCCA, S.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; PAPA, F. O.; RAMOS, A. A.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; OBA, E. Comparison of three different extenders on Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) semen freezability. **Andrologia**, v. 50, n. 1, p. e12830, 2018.