



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

EDILENE PINHEIRO FERREIRA

EFEITOS DE DIFERENTES CRIOPROTETORES INTRACELULARES NO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE *Prochidolus brevis* (CHARACIFORMES:
PROCHILODONTIDAE)

FORTALEZA

2024

EDILENE PINHEIRO FERREIRA

EFEITOS DE DIFERENTES CRIOPROTETORES INTRACELULARES NO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE *Prochidolus brevis* (CHARACIFORMES:
PROCHILODONTIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dra. Carminda Sandra Brito
Salmito Vanderley

Coorientador: Marcos Luiz da Silva Apoliano

FORTALEZA

2024

EDILENE PINHEIRO FERREIRA

EFEITOS DE DIFERENTES CRIOPROTETORES INTRACELULARES NO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE *Prochidolus brevis* (CHARACIFORMES:
PROCHILODONTIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 19 / 12 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Renata Vieira do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Apoio Cearense (FUNCAP) pelos subsídios que viabilizaram a realização desta pesquisa.

A Deus, pela sabedoria, força e saúde concedida. À minha família, especialmente aos meus queridos e valiosos pais, Newton e Eunice, e aos meus irmãos Neurenice, Neuriane, Elias, Natanael e Mateus, que incondicionalmente me apoiaram e incentivaram durante esta jornada. Agradeço por serem meu alicerce, minha fonte de conforto e inspiração! Também não posso deixar de mencionar meus sobrinhos queridos “Vitória, Davi, Ana Júlia e Pedro”, que certamente fazem parte dessa história. Amo vocês!

Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Sandra Salmito, por seu acolhimento, orientação e paciência, que, mesmo diante das dificuldades, deu suporte e apoio para que concretizasse essa pesquisa. Da mesma forma, expresso minha imensa gratidão ao meu coorientador Marcos Apoliano por todo apoio e atenção, principalmente nos momentos difíceis, quando tudo se tornou mais desafiador. Sou extremamente grata pela parceria e pelas trocas de ideias que foram essenciais para que chegasse até aqui. Valeu “Marcão”!

À banca, em particular, o Prof. Alexandre Sampaio e a Prof^a Renata Vieira, por aceitarem o convite e pelas contribuições valiosas.

Aos meus colegas de pós-graduação do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), em especial, a Yara, Jéssica, Tatiana, João, Pâmela e Thiago que me auxiliaram na realização dos experimentos. Sou grata pelo apoio acolhedor e todo conhecimento compartilhado. Também expresso minha gratidão a todos os bolsistas de Iniciação Científica que se dedicaram com afinco nos experimentos e análise. Foi gratificante ter compartilhado essa trajetória com vocês.

À minha querida amiga Thayara, por sempre me escutar, apoiar e, principalmente, me motivar, mesmo à distância. Aos meus amigos da graduação que se tornaram família “Sandy, Árgira e Elizabethy”. Ao meu “amigue” Rafael, obrigada por tudo!

Aos meus colegas de trabalho do Ministério que foram flexíveis e me apoiaram durante este processo.

Aos meus amigos e familiares por todo incentivo, apoio e amor. A todos vocês expresso a minha inteira gratidão!

A Deus.

Aos meus pais, Newton e Eunice, por seu amor incondicional e apoio constante.

RESUMO

A curimatã comum (*Prochidolus brevis*) é um peixe migratório de importância para a pesca comercial e de subsistência, que devido a fatores ambientais e antrópicos encontra-se com sua sobrevivência ameaçada. Assim, a criopreservação seminal emerge como uma ferramenta fundamental para conservação de gametas de peixes, utilizando-os durante as técnicas reprodutivas na piscicultura. Essa biotecnologia envolve o uso de meios crioprotetores, que previnem a formação de cristais de gelo intracelular, reduzindo os danos espermáticos causados pelo congelamento. Portanto, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores intracelulares na criopreservação seminal de *P. brevis*, a fim de aprimorar os protocolos já existentes para a espécie. Para isso, vinte e cinco machos sexualmente maduros de curimatã foram induzidos hormonalmente à espermiacção com uma dosagem única de extrato hipofisário de carpa (EHC; 0,4 mg.kg⁻¹) por via intracelomática. Após 14 horas de indução, os animais foram sedados e o sêmen foi coletado por meio de leve massagem abdominal. As amostras foram previamente analisadas e, aquelas que apresentaram motilidade superior a 80%, foram selecionadas para a formação de seis *pools*. Os tratamentos consistiram de *pools* diluídos em glicose 5%, na proporção 1:9 (sêmen: diluente), mais a adição de diferentes concentrações de crioprotetores intracelulares: etilenoglicol (EG – 5%, 10% e 15%), metanol (ME – 5%, 10% e 15%) e dimetilformamida (DMF – 5%, 10% e 15%), além do dimetilsulfóxido (DMSO – 10%), utilizado como grupo controle. As amostras foram envasadas, congeladas e, posteriormente, armazenadas em botijões criogênicos a -196 °C. Após 30 dias, as amostras foram descongeladas e analisadas quanto aos seguintes parâmetros espermáticos: cinética, morfologia, integridade do DNA e Integridade da membrana plasmática. Como resultado, verificou-se que maiores taxas de motilidade total foram observadas para o metanol (P<0,05), independentemente da concentração utilizada. Comportamento semelhante foi observado na morfologia e integridade de membrana para os tratamentos metanol e DMSO (P>0,05), enquanto a dimetilformamida a 5% e 15% apresentaram os menos índices de qualidade espermática (P<0,05). Conclui-se que, dentre os crioprotetores testados, o meio com 10% de metanol associado a glicose 5% é uma alternativa promissora ao uso de DMSO durante criopreservação seminal de *P. brevis*.

Palavras-chave: DMSO, etilenoglicol, metanol, dimetilformamida, curimatã comum.

ABSTRACT

The common curimatã (*Prochidolus brevis*) is a migratory fish of significant importance for commercial and subsistence fishing, which is threatened in its survival due to environmental and anthropogenic factors. Thus, seminal cryopreservation emerges as a fundamental tool for the conservation of fish gametes, utilizing them during reproductive techniques in aquaculture. This biotechnology involves the use of cryoprotective agents, which prevent the formation of intracellular ice crystals, reducing the sperm damage caused by freezing. Therefore, this research aims to evaluate the effects of different types and concentrations of intracellular cryoprotectants on the seminal cryopreservation of *P. brevis*, in order to enhance the existing protocols for the species. For this purpose, twenty-five sexually mature male curimatãs were hormonally induced to produce sperm using a single dosage of carp pituitary extract (CPE; 0.4 mg/kg⁻¹) via intracoelomic injection. After 14 hours of induction, the animals were sedated, and semen was collected through gentle abdominal massage. The samples were initially analyzed, and those exhibiting motility higher than 80% were selected to form six pools. The treatments consisted of pools diluted in 5% glucose at a ratio of 1:9 (semen:diluent), with the addition of different concentrations of intracellular cryoprotectants: ethylene glycol (EG – 5%, 10%, and 15%), methanol (ME – 5%, 10%, and 15%), and dimethylformamide (DMF – 5%, 10%, and 15%), in addition to dimethylsulphoxide (DMSO – 10%), which was used as a control group. The samples were bottled, frozen, and subsequently stored in cryogenic containers at -196 °C. After 30 days, the samples were thawed and analyzed for the following sperm parameters: motility, morphology, DNA integrity, and plasma membrane integrity. The results showed that higher total motility rates were observed for methanol ($P < 0.05$), regardless of the concentration used. A similar behavior was observed in morphology and membrane integrity for the methanol and DMSO treatments ($P > 0.05$), while dimethylformamide at 5% and 15% showed the lowest sperm quality indices ($P < 0.05$). It is concluded that, among the cryoprotectants tested, the medium with 10% methanol associated with 5% glucose is a promising alternative to the use of DMSO during the seminal cryopreservation of *P. brevis*.

Keywords: DMSO, ethylene glycol, methanol, dimethylformamide, common curimatã.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de Curimatã comum (<i>Prochidolus brevis</i> , Steindachner, 1875).....	12
Figura 2 - Coleta do sêmen de <i>P. brevis</i>	22
Figura 3 - Botijão criogênico.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tratamentos experimentais para criopreservação do sêmen de <i>P. brevis</i>	10
Tabela 2 –	Média \pm desvio-padrão dos parâmetros cinéticos (porcentagem de espermatozoides móveis – motilidade; velocidade curvilinear – VCL; velocidade em linha reta – VSL; e velocidade média do percurso – VAP) do sêmen criopreservado <i>P. brevis</i> e sua comparação com o grupo controle.....	27
Tabela 3 –	Média \pm desvio-padrão da Morfologia espermática (%), Integridade da Membrana plasmática (%) e Integridade do DNA espermático (%) do sêmen criopreservado de <i>P. brevis</i> com diferentes crioprotetores e concentrações.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	Espécie, biologia e aspectos reprodutivos de <i>Prochidolus brevis</i>	12
2.2	Taxonomia (FISHBASE, 2018).....	13
2.3	Aplicação da criopreservação de sêmen de peixes	14
2.4	Meios de congelação: diluentes e crioprotetores.....	15
2.5	Avaliação da qualidade espermática	17
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVOS	21
4.1	Objetivos específicos.....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1	Local de trabalho	22
5.2	Coleta do sêmen e manejo dos reprodutores	21
5.3	Formação dos Pools e criopreservação do sêmen	23
5.4	Análise da qualidade seminal	24
5.5	Análise estatística	26
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
7	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Entre as espécies de peixes brasileiros com potencial econômico e ecológico destacadas para produção comercial e conservação, encontra-se o *Prochilodus brevis*, conhecido popularmente como bocachico brasileiro ou curimatã comum. Essa espécie desempenha um papel ecológico relevante nos ecossistemas fluviais que ocupam, principalmente devido ao seu hábito alimentar detritívoro, que contribui para o equilíbrio trófico (NUNES *et al.*, 2016). Além disso, possui alto valor comercial, sendo amplamente explorada na região Nordeste do Brasil, especialmente por comunidades ribeirinhas que dependem dela para subsistência (ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2020).

Por ser um peixe reofilico, o curimatã comum realiza extensas migrações contra a correnteza durante a estação chuvosa, um comportamento essencial para desencadear uma cascata hormonal que regula sua reprodução. Entretanto, as interferências ambientais, como a construção de barragens e a redução do volume de chuvas, comprometem esse processo natural, prejudicando sua capacidade reprodutiva e colocando em risco sua conservação (NUNES *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o emprego das biotecnologias reprodutivas, como a criopreservação seminal, surgem como excelente alternativa para piscicultura comercial e conservação de recursos genéticos. Essas biotécnicas permitem o armazenamento de gametas sob baixas temperaturas por tempo indeterminado, o que possibilita resolver questões relacionadas à assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, bem como reduzir o número de reprodutores mantidos nas estações (VIVEIROS; GODINHO, 2009; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2017).

O sucesso da criopreservação depende do uso de meios criodiluidores compostos por diluentes e crioprotetores, responsáveis por nutrir as células espermáticas e protegê-las durante os processos de congelação e descongelação (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2016). Os crioprotetores devem apresentar baixa toxicidade e alta solubilidade no meio, sendo geralmente divididos em duas categorias: crioprotetores intracelulares (permeáveis), que atuam desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior da célula, dificultando a formação de cristais de gelo, e crioprotetores extracelulares (não permeáveis), que são opcionais e se concentram em revestir a superfície externa da célula espermática, estabilizando sua membrana e restaurando os lipídios perdidos durante o choque térmico (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2016).

Pesquisas sobre a criopreservação do sêmen de curimatãs (*Prochilodus brevis*) têm explorado diversos crioprotetores intracelulares, destacando-se o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol e o metilglicol (MG). Estudos demonstraram uma boa interação entre o meio de congelamento composto por glicose a 5% e DMSO a 10% para o sêmen de *P. brevis* (LOPES *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2016). Além desses, a incorporação de amidas, como a dimetilformamida (DMF), mostrou efeitos positivos na qualidade espermática do sêmen pós-descongelado de peixes reofílicos (PERRY *et al.*, 2019), embora não tenha sido testado ainda para o sêmen de curimatã.

Apesar de imprescindíveis, os crioprotetores podem ter efeitos tóxicos nas células, resultando em alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que podem comprometer a qualidade espermática (FIGUEROA *et al.*, 2016). Vale ressaltar que, devido às especificidades de cada espécie, a combinação de meios de congelamento varia, tornando mais complexa a identificação do fator ideal para cada uma, uma vez que esses agentes atuam de maneira distinta (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2016). Portanto, é essencial otimizar e aperfeiçoar os tipos, concentrações e diluições utilizadas na criopreservação do esperma de peixes (ZENG *et al.*, 2024).

Nesse contexto, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores intracelulares na criopreservação seminal de *P. brevis*, a fim de aprimorar os protocolos já existentes para a espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espécie, biologia e aspectos reprodutivos de *Prochidolus brevis*

O *Prochidolus brevis* (Steindachner, 1875) popularmente conhecido como curimatã comum (Figura 1) é um peixe de água doce nativo do semiárido brasileiro pertencente à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e à família Prochilodontidae. É endêmico dos rios do Piauí, Rio Grande do Norte e Ceará, ocorrendo atualmente por todo Nordeste e parte do Sudeste e Sul do país (DOURADO *et al.*, 1971; DOURADO, 1981). Apresenta o corpo fusiforme e alongado, lábios carnosos e boca prostrátil com pequenos dentes adaptados para captura do alimento do fundo (NAKATINI *et al.*, 2001). Os adultos dessa espécie apresentam, em média, 23 a 30 centímetros de comprimento; seu peso pode variar entre 215 a 513 gramas (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Embora as fêmeas sejam ligeiramente maiores que os machos, principalmente durante o período reprodutivo, não se observa dimorfismo sexual para *P. brevis* (GURGEL; VERANI; CHELLAPPA, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012). Já em confinamento, o crescimento é mais lento em comparação ao seu ambiente natural, e os exemplares desta espécie podem atingir valores de peso e comprimento de 200g e inferior a 20 cm (LEITE *et al.*, 2018, NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Figura 1- Exemplar de Curimatã comum (*Prochidolus brevis*, Steindachner, 1875)



Fonte: Acervo do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes

O Curimatã é um peixe gregário que não defende território e prefere habitar as áreas mais profundas dos corpos d'água (ARAUJO; GURGEL, 2002). As pós-larvas alimentam-se principalmente de plâncton e, à medida que atingem a idade adulta, passam a consumir matéria orgânica e micro-organismos associados à lama, além de restos de animais e vegetais, caracterizando hábito alimentar detritívoro/iliofago (DOURADO, 1981). Sua dieta detritívora permite que a espécie atue na transferência de energia e biomassa entre os níveis superiores e inferiores da cadeia trófica (GURGEL; VERANI; CHELLAPPA *et al.*, 2012), promovendo a

rotação rápida de nutrientes necessários para a sustentação da produção primária (MOREIRA, 2015). Já foi registrado que a perda de espécies detritívoras como o *P. brevis* pode alterar fluxo de carbono orgânico e comprometer o metabolismo dos ecossistemas (TAYLOR; FLECKE; HALL *et al.*, 2006).

Em relação às características reprodutivas, o *Prochilodus brevis* é um peixe reofílico que realiza extensas migrações rumo às cabeceiras dos rios para se reproduzir, fenômeno conhecido como piracema. Durante essa jornada, fatores ambientais, como aumento do fluxo hídrico e variações de temperatura, atuam como estímulos que desencadeiam elevações significativas nos níveis de hormônios gonadotróficos, especialmente os hormônios luteinizantes (LH) e os hormônios folículo-estimulantes (FSH), que regulam a maturação gonadal e a ovulação (VIEIRA *et al.*, 2018). Seu ciclo reprodutivo é caracterizado por: desova total, desenvolvimento dos ovócitos em grupos sincronizados, ovos sem aderência, desenvolvimento embrionário rápido e prole sem proteção por parte dos pais (COSTA *et al.*, 2012).

Em condições de cativeiro, a reprodução natural dessa espécie é dificultada devido à ausência desses estímulos ambientais, exigindo a utilização de hormônios exógenos, como o extrato de hipófise de carpa (EHC) e a gonadotrofina coriônica humana (HCG), para induzir a reprodução. Protocolos recentes demonstraram sucesso na reprodução causada por *P. brevis*, com taxas de fertilização superiores a 80% quando utilizados hormônios em combinação com manejos de simulação de condições ambientais da piracema, como fluxo contínuo de água (LIMA *et al.*, 2021).

A espécie é considerada uma das mais importantes para a pesca comercial brasileira, seja para subsistência ou para pesca esportiva (SILVA *et al.*, 2005). Entretanto, a construção de hidroelétricas, a sobrepesca, a falta de chuva e a poluição são alguns fatores que têm afetado a migração de espécies e tem também alterado a dinâmica dos rios, ameaçando a sobrevivência de muitas espécies de peixes, particularmente os reofílicos, como o *P. brevis* (NUNES *et al.*, 2016).

2.2 Taxonomia (FISHBASE, 2018)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875)

2.3 Aplicação da criopreservação de sêmen de peixes

A criopreservação consiste no armazenamento de gametas em nitrogênio líquido a -196°. Nesta temperatura, a viabilidade das células e tecidos vivos são mantidos, conservando-as geneticamente imóveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). Devido às suas aplicações potenciais, essa biotecnologia evoluiu substancialmente nas últimas décadas, com diversas pesquisas voltadas para a criopreservação do sêmen de peixes (ASTURIANO *et al.*, 2017).

A prática de criopreservação de sêmen para aquicultura teve início com os estudos de Blaxter (1953), que utilizou sêmen congelado para fertilizar ovos de arenque (*Clupea harengus Linnaeus*, 1758). Desde então, o interesse pelo uso dessa técnica tem crescido, com prioridade para sua aplicação em espécies de relevância comercial (BUSTAMANTE *et al.*, 2019).

Entre os benefícios que essa biotécnica oferece estão a redução de problemas de assincronia gonadal entre machos e fêmeas, a simplificação no manejo dos reprodutores e a diminuição de custos ao evitar o transporte de animais vivos e a manutenção de grandes quantidades de reprodutores. Além disso, a técnica possibilita o cruzamento de peixes em diferentes épocas do ano, facilitando programas de hibridização e o estabelecimento de bancos de germoplasma. Esses bancos são essenciais para preservar a diversidade genética, utilizando gametas de animais selecionados em programas de melhoramento genético ou manipulados, como triplóides, clones e transgênicos (SILVA *et al.*, 2020).

Portanto, biotecnologias reprodutivas, como a criopreservação seminal, têm o potencial de avançar e complementar os esforços atuais da produção comercial e conservação de peixes, preservando e permitindo o gerenciamento da diversidade genética de espécies aquáticas (STREIT *et al.*, 2024). No entanto, a variação nas características espermáticas entre diferentes espécies de peixes requer ajustes nos protocolos de manejo, especialmente para a congelação e posterior uso em programas reprodutivos (ZANIBONI-FILHO; BALDISSEROTTO, 2015).

Maria e Carneiro (2012) apontam que o principal desafio desta biotécnica está na retirada do excesso de água do interior da célula espermática, pois a redução brusca de temperatura promove a formação de cristais de gelo intracelular que danificam as células espermáticas por meio do rompimento de sua membrana. Portanto, para que a biotecnologia seja bem-sucedida é necessário a interação de múltiplos fatores como; a coleta do material genético, adição de diluentes e crioprotetores, métodos de envase, tempo de resfriamento e taxas apropriadas de congelamento e descongelamento (MARIA; CARNEIRO, 2012; SALMITO-VANDERLEY, 2012).

De acordo com Lezcano (2001) o método de congelação celular pode ser dividido em três etapas principais: (1) as células são submetidas a uma solução crioprotetora com a capacidade de penetrar na célula e remover o excesso de água intracelular; (2) Posteriormente, a célula deve, por sua vez, regular a osmolaridade de modo a ficar isotônica ao meio extracelular, isso pode causar efeitos tóxicos e impacto osmótico nas mesmas, (3) Por fim, a temperatura é reduzida passando pelo ponto de congelação da água e da solução crioprotetora.

Existem uma diversidade de utensílios e equipamentos para congelar as amostras de sêmen, sendo os mais utilizados as rampas de congelação, dry shippers, freezers reguláveis e botijões criogênicos (CABRITA *et al.*, 2010). A utilização de sistemas portáteis, como os “dry shippers”, é vantajosa para o transporte seguro de amostras em campo, sendo amplamente utilizada em programas de melhoramento genético e conservação (FAO, 2021).

2.4 Meios de congelação: diluentes e crioprotetores

Independentemente da espécie, é necessário que o sêmen destinado ao processo de criopreservação seja diluído em um meio criodiluidor, composto por duas substâncias cruciais: um diluente e um crioprotetor. Esse meio de congelação é responsável por nutrir a célula espermática e protegê-las contra as injúrias durante a congelação e descongelação seminal (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2016).

Os diluidores são compostos essenciais em protocolos de conservação seminal, compostos geralmente por sais, carboidratos e agentes antioxidantes, que aumentam o volume do sêmen e fornecem suporte metabólico para os espermatozoides. Um diluente ideal deve cumprir critérios fundamentais, tais como: isotonicidade, para evitar a ativação precoce da motilidade espermática; estabilidade química e física durante o armazenamento, garantindo que as células espermáticas permaneçam viáveis; esterilidade, para prevenir contaminações

microbiológicas; e alta condutividade térmica, permitindo uma eficiente troca de calor entre o ambiente externo e o sêmen (CABRITA *et al.*, 2014).

Estudos mais recentes têm explorado a adição de substâncias como lipoproteínas de gema de ovo e agentes antioxidantes, como glutathione reduzida e vitamina E, nos diluentes, resultando em melhor proteção contra danos oxidativos e aumento da taxa de fertilização após o armazenamento (FATIMAH *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2022).

Os diluentes mais utilizados para conservar o sêmen de peixes, inclusive para a espécie em estudo, são soluções de glicose a 5% (LOPES *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2017) e o NaCl a 0,9% (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

Já os crioprotetores são compostos adicionados às soluções diluidoras com o objetivo de preservar os espermatozoides, protegendo-os contra danos que podem ocorrer durante o processo de congelamento e descongelamento. Essas substâncias ajudam a prevenir lesões estruturais e funcionais causadas principalmente pela formação de cristais de gelo e pelo estresse osmótico que afetam as células espermáticas (KOWALSKI *et al.*, 2020). Eles podem ser classificados em duas categorias: crioprotetores intracelulares (permeáveis) ou crioprotetores extracelulares (não permeáveis).

Os crioprotetores intracelulares consistem em soluções de baixo peso molecular que, por meio de suas funções coligativas, reduzem o ponto de congelamento no interior da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelular. Esses compostos são de uso obrigatório uma vez que aumentam significativamente a capacidade dos espermatozoides de resistir as temperaturas extremamente baixas (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2016).

Diversos agentes crioprotetores já foram testados na preservação do sêmen de peixes, dentre os quais, podemos citar os derivados de álcoois, como o etilenoglicol, o glicerol e o metilglicol, bem como os derivados de sulfóxidos e amidas, como o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida e a metilformamida (ELIOTT *et al.*, 2017). Para o sêmen de curimatã, foi detectado uma boa interação no sêmen criopreservado com glicose 5% e o crioprotetor DMSO a 10% (NUNES *et al.*, 2016; NASCIMENTO, *et al.*, 2017).

Por outro lado, os crioprotetores de ação externa recobrem a célula espermática e estabilizam sua membrana, reduzindo os efeitos negativos causados pela descongelamento (MARIA, 2005). Seu uso é opcional, no entanto, a adição dessas substâncias que pode incluir lipídios, proteínas ou açúcares, proporciona maior proteção às células espermáticas, atuando na recuperação de fosfolipídios perdidos durante o congelamento e descongelamento (VIVEIROS *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2019).

2.5 Avaliação da qualidade espermática

Um dos principais parâmetros para a avaliação da qualidade espermática é a motilidade, uma vez que esta característica está diretamente relacionada com a capacidade de fertilização dos espermatozoides (RURANGWA *et al.*, 2004). Essa análise pode ser realizada de forma subjetiva, na qual um avaliador estima a porcentagem de móveis em uma escala de 0 a 100% (TAITSON *et al.*, 2008).

Outra maneira de analisar os parâmetros cinéticos dos espermatozoides é por meio do programa Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), sendo este método mais objetivo. O CASA é um sistema automático (*hardware e software Sperm Class Analyzer - SCA*) que permite capturar, digitalizar e analisar imagens sequenciais, fornecendo informações precisas e significativas sobre o movimento individual de cada célula e subpopulações de espermatozoides (AMANN; KATZ, 2004). Através desse sistema, é possível avaliar a porcentagem de espermatozoides móveis (ou taxa de motilidade), assim como a porcentagem de espermatozoides com diferentes níveis de velocidade (rápida, média ou lenta), além de analisar a trajetória e a velocidade dos espermatozoides, incluindo: velocidade curvilínea (VCL - μms^{-1}), velocidade linear progressiva (VSL - μms^{-1}) e velocidade média da trajetória (VAP - μms^{-1}).

A análise da morfologia espermática é um dos critérios essenciais para determinar a qualidade do sêmen, sendo crucial para avaliar a viabilidade reprodutiva. Alterações morfológicas nos espermatozoides podem reduzir significativamente a motilidade, afetando a capacidade de fertilização (ALAVI; COSSON, 2006). Nos peixes, essas anormalidades são frequentemente classificadas como primárias, ou seja, originadas durante a espermatogênese devido a fatores genéticos ou fisiológicos, e secundárias, decorrentes de fatores externos como manejo inadequado, métodos de coleta ou processamento do sêmen (CABRITA *et al.*, 2014).

Estudos recentes indicam que a exposição a poluentes ambientais, como metais pesados e pesticidas, pode aumentar a incidência de patologias morfológicas em espermatozoides de peixes, influenciando negativamente a fertilização e o desenvolvimento embrionário (MARTÍNEZ-PARRA *et al.*, 2021). Além disso, técnicas de criopreservação, caso não sejam otimizadas, também podem induzir danos estruturais nos espermatozoides, como deformações na cabeça, peças intermediárias ou caudas, resultando em baixa motilidade e viabilidade (LIU *et al.*, 2022).

Patologias espermáticas como flagelo dobrado, cabeça isolada e gota citoplasmática proximal ou distal são frequentemente associadas a falhas na espermatogênese, podendo ser desencadeadas por fatores como doenças nos reprodutores, consanguinidade, deficiências

nutricionais e estresse ambiental. Essas anormalidades são classificadas como patologias primárias ou maiores, pois têm origem durante o desenvolvimento dos espermatozoides. Já patologias como flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia e microcefalia estão geralmente relacionadas a danos causados durante a coleta, manuseio ou processamento do sêmen, sendo classificadas como patologias secundárias ou menores (GONÇALVES *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Adicionalmente, a verificação da integridade da membrana plasmática é outro parâmetro importante, tendo em vista que durante o processo de congelamento seminal, a formação de cristais de gelo ou outros fatores podem danificar as células espermáticas, levando ao rompimento de sua membrana plasmática e, conseqüentemente, à sua morte/lise. Esta análise envolve a estimativa do percentual de células com membranas íntegras (vivas) ou com membranas danificadas (mortas) (PÉREZ-CEREZALES *et al.*, 2010).

A avaliação da integridade do DNA espermático é uma análise que serve como parâmetro de qualidade do sêmen e deve ser realizada rotineiramente nos laboratórios de reprodução. Essa análise pode ser realizada através do teste de dispersão da cromatina espermática (SCD). De maneira resumida, no SCD, os espermatozoides intactos são dispostos em uma lâmina contendo agarose, o que permite a manipulação de células não fixadas em um meio em suspensão. Em seguida, as lâminas são imersas em uma solução ácida que desnatura o DNA e, posteriormente, tratadas com uma solução de lise, cuja função é remover as membranas e proteínas. Após esses procedimentos, é possível observar o nucleóide com um núcleo central e um halo periférico de alças de DNA dispersas. Por fim, os espermatozoides com DNA fragmentado apresentam halos pequenos, enquanto aqueles com DNA intacto liberam alças de DNA, formando halos grandes. Dessa forma, a fragmentação do DNA, refletida pelo tamanho do halo, pode ser determinada com precisão usando o teste SCD, um método simples, barato e altamente reproduzível (FÉRNANDES *et al.*, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Prochilodus brevis, conhecido popularmente por curimatã comum, é um peixe migratório endêmico do semiárido brasileiro com grande potencial para piscicultura. Esta espécie contribui para o equilíbrio ecológico dos ambientes que ocupam, característica atribuída ao seu hábito alimentar detritívora quando adulta. Além disso, é um importante recurso para a pesca comercial e de subsistência, principalmente pelo consumo de suas ovas, conhecidas como “caviar do sertão”. Entretanto, interferências humanas têm prejudicado a manutenção dos estoques selvagens dessa espécie, colocando em risco suas populações naturais.

Nesse contexto, pesquisas focadas na criopreservação seminal de *P. brevis* tem sido aplicadas com o objetivo de subsidiar sua conservação e piscicultura. Este método permite o armazenamento de gametas sob baixas temperaturas a longo prazo, possibilitando que o sêmen seja mantido em bancos de germoplasmas ou usados em programas de reprodução. Além de preservar a diversidade genética de espécies ameaçadas como o *P. brevis*, essa prática é essencial para superar desafios comuns na piscicultura, como a assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, a sazonalidade reprodutiva e a redução de custos com a manutenção de reprodutores.

Protocolos eficazes de criopreservação dependem da interação de uma gama de fatores, tais como: meios de congelação, taxas de diluição, e os processos de congelação e descongelação. O uso de crioprotetores é fundamental, uma vez que eles reduzem os danos causados pelos cristais de gelo formados durante a congelação. Estudos já avaliaram o efeito de diversas substâncias crioprotetoras no sêmen de curimatã comum, apresentando resultados promissores com o dimetilsulfóxido (DMSO). Apesar de amplamente aplicado, o DMSO pode ter seu efeito reduzido devido à sua toxicidade. Considerando que a interação dos crioprotetores é espécie-específica, é importante testar diferentes tipos, concentrações e diluições de novos agentes como alternativas aos crioprotetores convencionais.

Nesse contexto, este trabalho justifica-se pela necessidade de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de crioprotetores intracelulares na criopreservação do sêmen de curimatã comum, com o objetivo de maximizar os resultados e minimizar a toxicidade desses compostos. Além disso, este estudo propõe-se em avaliar o efeito da dimetilformamida (DMF), que, embora tenha demonstrado efeitos positivos em sêmen de outras espécies, ainda não foi testada para o *P. brevis*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores intracelulares, no meio de congelamento seminal de *Prochilodus brevis*.

4.2 Objetivos específicos

- Testar diferentes concentrações (5%, 10% e 15%) dos crioprotetores intracelulares (etilenoglicol, metanol, dimetilformamida e DMSO) na criopreservação do sêmen de *P. brevis*.
- Verificar os efeitos da inclusão de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores de ação interna sobre os parâmetros de cinética, morfologia, integridade da membrana plasmática e integridade do DNA espermático.

5 MATERIAL E MÉTODOS

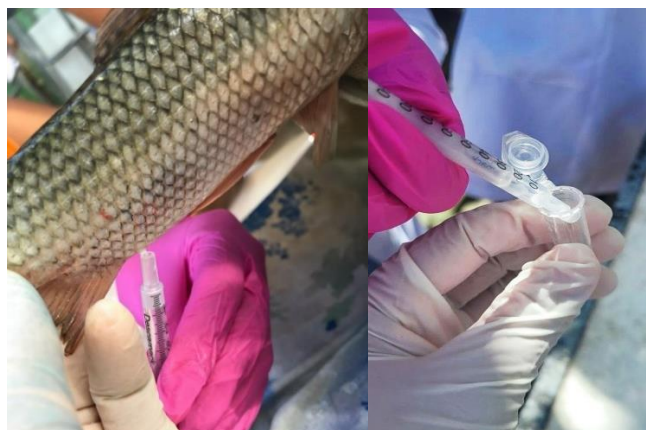
5.1 Local de trabalho

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará - UECE (número do protocolo: 001861/2024). Os experimentos foram realizados em julho de 2023 no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), do Núcleo Integrado (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), na Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Fortaleza-CE. Os animais utilizados neste estudo foram obtidos do plantel de reprodutores do LBRP, mantidos em tanques de fibra de vidro com capacidade aproximada de 7.100 litros, com aeração constante. Eles foram alimentados diariamente com ração comercial (28-32% proteína bruta), duas vezes ao dia, a uma taxa de arraçoamento de 3% da biomassa corporal.

5.2 Coleta do sêmen e manejo dos reprodutores

O manejo de coleta do sêmen foi realizado conforme os procedimentos laboratoriais descritos por Nunes *et al.* (2016) e Nascimento *et al.* (2017). Vinte e cinco machos de *P. brevis* foram selecionados com base em características indicativas de maturidade reprodutiva, tais como: presença de papila urogenital hiperêmica e liberação visível de sêmen após leve pressão na região abdominal. Os animais foram induzidos à reprodução com uma dose de extrato hipofisário de carpa (0,4 mg de EHC.kg⁻¹), administrada por meio de injeção intracelomática na base da nadadeira peitoral. Após 14 horas de indução, os animais foram sedados em uma solução à base de óleo de cravo (Eugenol Sigma-Aldrich®) na proporção de 1:10:1000 (Eugenol:álcool:água), até a perda de equilíbrio.

Em seguida, a cavidade intraperitoneal de cada animal foi cuidadosamente limpa para evitar a contaminação do sêmen por resíduos de fezes, urina e sangue. O sêmen foi coletado por meio de massagem abdominal no sentido crânio-caudal, utilizando seringas estéreis de 3,0 mL (Figura 2). O volume seminal foi transferido para eppendorfs graduados mantidos em caixa térmica à 4 °C. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas para análise no Sistema de Análise Seminal Auxiliado por Computador (CASA), utilizando o Software *Sperm Class Analyser* (SCA; Microptics; Barcelona, Espanha), configurado na função peixes.

Figura 3 - Coleta do sêmen de *P. brevis*

Fonte: Autor.

5.3 Formação dos Pools e criopreservação do sêmen

Após a análise objetiva no CASA, as amostras com taxas de motilidade superiores a 85% foram selecionadas para a formação de seis *pools*, compostos por amostras de sêmen de 3 animais. Cada *pool* foi avaliado quanto à concentração, integridade da membrana plasmática, integridade do DNA, morfologia e cinética espermática.

Para o procedimento de congelação do sêmen, uma alíquota de cada *pool* ($n = 6$) foi diluída em 5% de glicose na proporção de 1:9 (sêmen:diluyente). Ao meio diluidor, foram acrescentadas três concentrações diferentes dos crioprotetores intracelulares: etilenoglicol (EG – 5%, 10% e 15%), metanol (ME – 5%, 10% e 15%) e dimetilformamida (DMF – 5%, 10% e 15%), além do dimetilsulfóxido (DMSO – 10%) utilizado como grupo controle. As substâncias crioprotetoras avaliadas, e suas respectivas concentrações, estão detalhadamente descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos experimentais para criopreservação do sêmen de *P. brevis*.

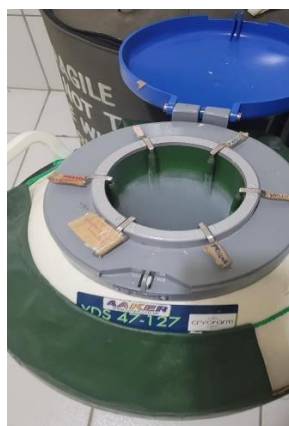
Tratamentos	Soluções diluidoras (%)	Proporção (sêmen:diluyente)
C	Controle 5% + DMSO 10%	1:9
T1	Glicose 5% + EG 5%	1:9
T2	Glicose 5% + EG 10%	1:9
T3	Glicose 5% + EG 15%	1:9
T4	Glicose 5% + ME 5%	1:9
T5	Glicose 5% + ME 10%	1:9

T6	Glicose 5% + ME 15%	1:9
T7	Glicose 5% + DMF 5%	1:9
T8	Glicose 5% + DMF 10%	1:9
T9	Glicose 5% + DMF 15%	1:9

* EG-etilenoglicol, ME-metanol, DMF-dimetilformamida, DMSO-dimetilsulfóxido.

Após o preparo das soluções, as amostras foram envasadas três palhetas francesas de 0,25 mL, seladas adequadamente com álcool polivinílico. As amostras foram então alocadas em racks de metal e mantidas por 10 minutos à 4 °C (tempo para equilíbrio). Em seguida, as amostras foram congeladas utilizando vapor de nitrogênio líquido em *dry shipper* a -176 °C por um período de 30 minutos e, posteriormente, armazenadas em botijões criogênicos a -196 °C (Figura 3). Após um período de 30 dias, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 30 °C durante 16 segundos (NUNES *et al.*, 2016), e analisadas de acordo com os parâmetros de qualidade espermática.

Figura 4 - Botijão criogênico



Fonte: Autor.

5.4 Análise da qualidade seminal

Amostras de sêmen fresco e criopreservado de cada pool (n = 6) foram destinadas às análises de concentração (espermatozoides.mL⁻¹), integridade da membrana (%), integridade do DNA, morfologia (%) e cinética espermática (motilidade total [%], velocidade curvilínea [VCL – μm.s⁻¹], velocidade em linha reta [VCL – μm.s⁻¹] e velocidade média de percurso [VCL – μm.s⁻¹]).

Para determinar a concentração, alíquotas de sêmen in natura foram fixadas em solução de citrato de formaldeído a 4%, na proporção de 1:4000 (sêmen:solução fixadora). Após diluição, foram pipetados 20 μL da amostra em uma câmara de Neubauer, e os cinco quadrantes da câmara foram analisados sob um microscópio ótico com aumento de 400x para contagem das células (LEITE *et al.*, 2013).

Para a análise de cinética espermática, 1 μL de sêmen foi misturado com 100 μL de solução ativadora (NaCl 50 mM – 125 mOsm) na câmara de Makler. As amostras foram analisadas aproximadamente 15 segundos após o processo de ativação através de análise objetiva no Sistema de Análise Seminal (CASA) utilizando o software Sperm Class Analyzer (SCA, Microptics – Barcelona - Espanha, versão 3.2, NUNES *et al.*, 2016), configurado na função peixes. Os parâmetros cinéticos avaliados foram: motilidade total (%); velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}^{-1}$); velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}^{-1}$); velocidade média de percurso (VAP - $\mu\text{m/s}^{-1}$).

Para verificar a integridade da membrana espermática, foi empregado o método de coloração de eosina-nigrosina (adaptado de BLOM, 1950). Para isso, foram preparados esfregaços utilizando 5 μL de espermatozoides misturados com 10 μL de eosina e 10 μL de nigrosina, numa proporção de 1:2:2 (sêmen:eosina:nigrosina). A análise dos esfregaços foi realizada sob um microscópio de luz com ampliação de 400x. Foi feita a leitura deslizando pelos campos visuais até atingir a contagem de 200 espermatozoides. Os espermatozoides incolores foram considerados vivos (indicando uma membrana citoplasmática intacta) ou mortos, identificados pela coloração rosada ou avermelhada, que sugere uma ruptura na membrana citoplasmática.

Para avaliar a integridade do DNA espermático, foi empregado o teste SCD (Sperm Chromatin Dispersion), que permitiu a análise da taxa de fragmentação da cromatina dos espermatozoides, conforme a metodologia de Fernandez *et al.* (2005), adaptada e descrita por Almeida Monteiro *et al.* (2020). Assim, cerca de 1 μL de sêmen fresco foi diluído em 1,5 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e mantido em banho-maria a 37 °C até uso posterior. Em seguida, 25 μL da solução de sêmen-PBS foram misturados com 50 μL de agarose de baixo peso molecular (Low-Weight Agarose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e alíquotas de 2 μL dessa mistura foram depositadas em cada um dos 10 pontos de uma lâmina previamente preparada com agarose altamente purificada (NA Agarose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após isso, as lâminas foram acondicionadas em uma superfície metálica refrigerada a 4 °C por cinco minutos. Em seguida, foram submetidas a banhos em diferentes soluções: solução ácida (ácido clorídrico (HCl) e água milli-Q, por sete minutos); solução de lise (cloreto de sódio

(NaCl), dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), β -mercaptoetanol, solução Tris-HCl e água destilada, por 25 minutos); água destilada (por cinco minutos); e álcool 70%, álcool 90% e álcool absoluto, respectivamente (por dois minutos cada). Após o procedimento, as amostras foram coradas com um kit Panotic (RenyLab Chemical and Pharmaceutical Ltda., Barbacena, MG, Brasil); cada lâmina foi imersa em cada corante por 10, 20 e 20 segundos, respectivamente. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. Duzentos espermatozoides foram avaliados utilizando um microscópio óptico de contraste de fase acoplado a uma câmera (200 \times ; Nikon Eclipse 50 i, Tóquio, Japão) para investigar a incidência de halo ao redor da cabeça do espermatozoide. Nesta análise, células apresentando um halo externo indicavam dispersão da cromatina espermática (DNA intacto), enquanto células sem halo indicavam fragmentação do DNA.

Para a análise da morfologia, o sêmen foi fixado em solução de citrato formolizada a 4% na proporção de 1:10 (sêmen: fixador). Em seguida, a amostra foi corada com Rosa Bengala na proporção de 3:20 (corante: sêmen fixado). Essa mistura foi aplicada em uma lâmina para realização de esfregaço. Foram preparadas duas lâminas para cada tratamento que foram analisadas sob um microscópio óptico com ampliação de 400x. Cem espermatozoides foram avaliados em cada lâmina e classificados como normais ou danificados de acordo com os critérios estabelecidos por Miliorini *et al.* (2011).

5.5 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificação da distribuição dos resíduos e homocedasticidade de variâncias entre os tratamentos. Quando necessário, os dados foram submetidos a uma transformação logarítmica para adequá-los à análise de variância (ANOVA). As comparações entre as médias dos tratamentos foram realizadas utilizando o teste de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão das médias, considerando o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). O software “SigmaPlot 12.0” foi utilizado para a análise estatística dos resultados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os *pools* de sêmen fresco utilizados para constituir os tratamentos apresentaram uma concentração média de $58,44 \times 10^9$ espermatozoides por mL, com $67,33 \pm 4,80\%$ dos espermatozoides exibindo membrana intacta, $80,16 \pm 2,06\%$ com morfologia normal, $78,5 \pm 4,37\%$ com DNA intacto e $60,42 \pm 15,4\%$ de espermatozoides moveis.

Em relação à motilidade do sêmen criopreservado, observou-se uma interação significativa entre os crioprotetores e as concentrações utilizadas (Tabela 2). Os tratamentos T4, T5 e T6, que utilizaram metanol nas concentrações de 5%, 10% e 15%, apresentaram os melhores resultados em termos de motilidade espermática ($P < 0,05$) com médias variando de $45,08 \pm 17,54\%$, $54,78 \pm 8,45\%$ e $47,36 \pm 5,96\%$, respectivamente. Esses valores diferiram significativamente do grupo controle, que exibiu uma motilidade média de $26,98 \pm 8,57\%$ ($P < 0,05$). Já o tratamento a 5% com dimetilformamida mostrou motilidade superior em comparação ao controle ($P < 0,05$). No entanto, foi observado um declínio nas taxas de motilidade nas concentrações de 10% e 15% ($13,16 \pm 11,01\%$ e $2,05 \pm 1,06\%$, respectivamente).

Tabela 2 - Média \pm desvio-padrão dos parâmetros cinéticos (porcentagem de espermatozoides móveis – motilidade; velocidade curvilínea – VCL; velocidade em linha reta – VSL; e velocidade média do percurso – VAP) do sêmen criopreservado *P. brevis* e sua comparação com o grupo controle.

Tratamentos	Motilidade (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
C	$26,98 \pm 8,57^{bc}$	$27,18 \pm 3,15^a$	$7,76 \pm 2,04^{ab}$	$15,86 \pm 4,37^a$
T1	$2,50 \pm 2,00^d$	$19,68 \pm 5,96^{bc}$	$4,70 \pm 3,71^{abc}$	$8,26 \pm 5,37^{bc}$
T2	$15,65 \pm 11,05^{cd}$	$23,75 \pm 3,89^{ab}$	$8,18 \pm 3,46^{ab}$	$13,62 \pm 3,75^{ab}$
T3	$32,26 \pm 2,48^{ab}$	$20,32 \pm 1,08^{bc}$	$3,90 \pm 1,01^{bcd}$	$8,13 \pm 1,65^{bc}$
T4	$45,08 \pm 17,54^{ab}$	$29,88 \pm 4,12^a$	$8,80 \pm 2,57^{ab}$	$15,44 \pm 3,37^a$
T5	$54,78 \pm 8,45^a$	$28,34 \pm 4,21^a$	$7,72 \pm 2,62^a$	$17,34 \pm 4,47^a$
T6	$47,36 \pm 5,96^{ab}$	$30,22 \pm 4,02^a$	$8,82 \pm 1,78^a$	$16,16 \pm 3,91^a$
T7	$33,98 \pm 2,90^{ab}$	$29,18 \pm 4,65^a$	$9,18 \pm 2,55^a$	$16,00 \pm 4,02^a$
T8	$13,16 \pm 11,01^{cd}$	$18,13 \pm 4,35^{bc}$	$3,74 \pm 0,94^{cd}$	$6,32 \pm 2,53^c$
T9	$2,05 \pm 1,06^d$	$14,40 \pm 3,96^c$	$1,42 \pm 1,15^d$	$4,80 \pm 1,56^c$

*C: grupo controle (DMSO - 10%); T1, T2 e T3: Etilenoglicol (5, 10 e 15%); T4, T5 e T6: Metanol (5, 10 e 15%); T7, T8 e T9: Dimetilformamida (5, 10 e 15%). * Para uma mesma

variável, médias com letras minúsculas distintas, são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

A seleção dos crioprotetores é um fator crucial para a criopreservação do sêmen, pois diferentes substâncias podem impactar significativamente a motilidade espermática e outros parâmetros cinéticos (YANG *et al.*, 2023). Assim, a personalização do protocolo de criopreservação, considerando as características específicas do sêmen de *P. brevis*, é essencial para otimizar os resultados. Nesta pesquisa, a utilização de metanol a 10% resultou em uma motilidade pós-descongelamento significativamente maior do que a observada no controle (DMSO) e nos outros crioprotetores, etilenoglicol (EG) e dimetilformamida (DMF) ($P > 0,05$). Devido à sua rápida penetração e baixa toxicidade, esse crioprotetor também se mostrou eficaz para o esperma de peixes de água doce (YANG *et al.*, 2023; NICOLETI, 2024).

Em um estudo sobre a criopreservação do esperma de *B. orbignyanus*, observou-se que a utilização da dimetilformamida (DMF) na concentração de 7,5%, associada ao diluidor BTS (Beltsville Thawing Solution™), proporcionou maior proteção à função espermática e à estrutura celular, com uma motilidade média de 66%, significativamente maior do que a observada nos outros crioprotetores avaliados (PERRY *et al.*, 2019). Quando testado pela primeira vez no sêmen de curimatã (*P. brevis*), o DMF apresentou motilidade inferior àquela observada no estudo mencionado, indicando que seu uso em altas concentrações pode reduzir seu efeito crioprotetor. Esses resultados ressaltam a necessidade de testar diferentes crioprotetores para diferentes espécies tendo em vista a alta especificidade dos efeitos tóxicos associados a esses compostos (HOLT, 2000).

Em relação as velocidades espermáticas, houve efeitos significativos entre os tratamentos avaliados ($P < 0.05$). Para o parâmetro de Velocidade Curvilínea (VCL) o uso do metanol nas concentrações de 5, 10 e 15% proporcionaram melhores resultados ($29,88 \pm 4,12 \mu\text{m.s}^{-1}$, $28,34 \pm 4,21 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $30,22 \pm 4,02 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivamente) se comparado os demais tratamentos, contudo não houve diferenças significativas entre si ($P > 0.05$). Segundo Morales (1986), o VCL é um dos parâmetros mais relevantes em peixes, pois o movimento circular dos espermatozoides facilita o encontro da micrópila, permitindo a entrada no gameta no oócito e, assim, a fertilização. Neste estudo, embora não tenham sido feitos testes de fertilização, faz-se importante observar esses parâmetros, uma vez que também estão correlacionados com o potencial fertilizante dos espermatozoides.

Em relação à velocidade linear (VSL) foi detectado que a utilização de dimetilformamida na concentração de 5% resultou em uma média de $9,18 \pm 2,55 \mu\text{m.s}^{-1}$, porém

a partir do aumento das concentrações de 10 e 15%, observou-se uma redução significativa desse valor.

No que se refere a Velocidade Média do Percurso (VAP) o grupo controle obteve $15,86 \pm 4,37 \mu\text{m.s}^{-1}$, mantendo média semelhante aos tratamentos com metanol ($15,44 \pm 3,37 \mu\text{m.s}^{-1}$, $17,34 \pm 4,47 \mu\text{m.s}^{-1}$, $16,16 \pm 3,91 \mu\text{m.s}^{-1}$). Em relação à velocidade média do percurso (VAP), valores significativamente inferiores ($P < 0,05$) foram observados para os tratamentos T1 com etilenoglicol a 5% ($8,26 \pm 5,37 \mu\text{m.s}^{-1}$) e tratamento T9 com dimetilformamida 15% ($4,80 \pm 1,56 \mu\text{m.s}^{-1}$). Os valores de VAP para o sêmen criopreservado com metanol foram semelhantes aos do grupo controle, não demonstrando diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$).

Nunes *et al.* (2016), avaliaram quatro meios de congelamento no sêmen de *P. brevis*, consistindo em 5% de glicose + metilglicol 10%; 5% de glicose + DMSO 10%; 0,9% de NaCl + metilglicol 10%; e 0,9% de NaCl + DMSO 10%. Os maiores índices de motilidade para o sêmen criopreservado foram alcançados com DMSO, resultando em uma média de $32,87 \pm 1,21\%$, independentemente do diluente utilizado. Da mesma forma, os valores de VCL, VSL e VAP foram superiores com o DMSO, apresentando médias de $46,53 \pm 0,5 \mu\text{m.s}^{-1}$, $25,78 \pm 0,56 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $36,56 \pm 0,58 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivamente. No entanto, ao comparar esses resultados com os obtidos no presente estudo, verificou-se que o desempenho do DMSO em quase todos os parâmetros cinéticos avaliados foram inferiores ao sêmen congelado com metanol, independentemente da concentração utilizada ($P > 0,05$).

Resultado semelhante foi encontrado por Lopes *et al.* (2014) para o sêmen criopreservado de curimatã comum. Os autores destacaram que, embora o DMSO seja um crioprotetor amplamente testado com bons resultados para espécies Characiformes, os percentuais de motilidade espermática foram significativamente inferiores quando comparado ao metilglicol. De forma similar, Viveiros *et al.* (2015) investigaram os efeitos de crioprotetores, como DMSO, metilglicol e metanol, combinados com diferentes soluções diluentes, na qualidade do esperma pós-descongelado de *Brycon orbignyanus* e *Prochilodus lineatus*. Os autores observaram que todas as amostras congeladas em DMSO apresentaram baixa qualidade, enquanto os espermatozoides congelados com glicose-metanol mostraram boa qualidade para o sêmen de *P. lineatus*. Essa baixa efetividade foi associada à sua toxicidade que, em concentrações mais altas, pode provocar redução da qualidade do esperma, o que pode ter ocorrido no presente trabalho e nos demais citados.

O metanol é um agente crioprotetor penetrante que atua por meio de suas propriedades coligativas, reduzindo o ponto de congelamento intracelular e proporcionando um ambiente menos prejudicial para os espermatozoides durante o congelamento (HOLT, 200b).

Possui um peso molecular menor e, portanto, uma permeação celular mais rápida quando comparado a outros compostos permeáveis, como DMSO, DMA e glicerol (VIVEIROS, 2011). Na presente pesquisa, foram encontrados resultados menos expressivos de motilidade para o sêmen congelado com etilenoglicol a 5% e dimetilformamida a 15%, indicando que, nessas concentrações, a eficácia desses crioprotetores é reduzida. Estudos corroboram essa observação, mostrando que, no caso das amidas como o DMF, concentrações superiores a 11% apresentaram efeito tóxico para o sêmen de *Colossoma macropomum* (VARELA *et al.*, 2012) e *Odontesthes bonariensis* (ALVES *et al.*, 2016), o que está em acordo com os dados encontrados neste estudo.

Os resultados referentes as análises de morfologia, integridade do DNA e Integridade da membrana do sêmen pós-descongelado de *P. brevis* constam na Tabela 3.

Tabela 3 - Média \pm desvio-padrão da Morfologia espermática (%), Integridade da Membrana plasmática (%) e Integridade do DNA espermático (%) do sêmen criopreservado de *P. brevis* com diferentes crioprotetores e concentrações.

Tratamentos	Morfologia (%)	Integridade do DNA (%)	Integridade da Membrana (%)
C	81,5 \pm 4,61 ^a	38,80 \pm 11,26 ^a	55,00 \pm 10,45 ^a
T1	65,20 \pm 5,43 ^{ab}	46,20 \pm 21,48 ^a	51,90 \pm 8,57 ^a
T2	66,58 \pm 3,11 ^{ab}	57,00 \pm 21,86 ^a	54,25 \pm 19,40 ^a
T3	58,12 \pm 6,8 ^{4b}	38,00 \pm 9,37 ^a	54,50 \pm 9,69 ^a
T4	66,18 \pm 6,26 ^{ab}	40,17 \pm 9,27 ^{ab}	50,17 \pm 14,40 ^{ab}
T5	74,62 \pm 10,71 ^a	47,70 \pm 9,98 ^c	22,50 \pm 3,51 ^c
T6	69,45 \pm 4,54 ^{ab}	59,90 \pm 16,24 ^c	24,25 \pm 8,98 ^c
T7	75,06 \pm 3,36 ^a	35,50 \pm 17,63 ^c	16,33 \pm 2,69 ^c
T8	68,68 \pm 3,48 ^{ab}	50,00 \pm 21,81 ^{bc}	30,20 \pm 2,77 ^{bc}
T9	59,80 \pm 7,13 ^b	53,20 \pm 9,14 ^{abc}	33,80 \pm 15,75 ^{abc}

*C: grupo controle (DMSO - 10%); T1, T2 e T3: Etilenoglicol (5, 10 e 15%); T4, T5 e T6: Metanol (5, 10 e 15%); T7, T8 e T9: Dimetilformamida (5, 10 e 15%). * Para uma mesma variável, médias com letras minúsculas distintas, são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (P<0.05).

A análise morfológica dos espermatozoides é fundamental para a avaliação da qualidade seminal, pois patologias espermáticas podem impactar diretamente a motilidade e o vigor espermático (NEYRÃO, 2022). Neste estudo, a taxa de espermatozoides normais foi

significativamente afetada pelos crioprotetores e suas concentrações (Tabela 3). O grupo controle apresentou uma proporção de espermatozoides normais de $81,5 \pm 4,61\%$, sem diferença estatística em relação aos grupos tratados com metanol a 10% ($74,62 \pm 10,71\%$) e dimetilformamida a 5% ($75,06 \pm 3,36\%$) ($P > 0,05$). No entanto, os espermatozoides criopreservados com 15% de etilenoglicol (EG) e 15% de Dimetilformamida (DMF) mostraram taxas de normalidade significativamente mais baixas em comparação ao controle ($P < 0,05$).

Esses achados são consistentes com os encontrados por Nascimento *et al.* (2017), que relataram porcentagens de espermatozoides normais de $75,95 \pm 12,29\%$ e $84,05 \pm 2,10\%$ para DMSO e metilglicol, respectivamente. Da mesma forma, Almeida-Monteiro *et al.* (2017) observaram taxas de normalidade de $63,08 \pm 1,92\%$ para DMSO e $55,44 \pm 2,31\%$ para metilglicol no sêmen de *P. brevis*. Ambos os crioprotetores, quando associados à glicose, também apresentaram resultados semelhantes no trabalho de Nunes *et al.* (2016), com percentuais de morfologia normal de $67,6 \pm 2,01\%$ para DMSO e $72,77 \pm 1,32\%$ para metilglicol.

Assim como observado por Nunes *et al.* (2016), neste estudo, a morfopatologia mais comum foi a cauda dobrada. Segundo a literatura, as anormalidades de cauda curta e cauda fortemente enrolada são aquelas que mais afetam a motilidade e, consequentemente, a capacidade de fertilização (MILIORINI *et al.*, 2011). No entanto, neste trabalho, esses índices de anormalidade foram considerados irrelevantes.

É reconhecido que o processo de criopreservação pode induzir diversos danos às células, que vão desde aos danos moleculares até aos subcelulares que incluem alterações no núcleo, juntamente com ocorrência da fragmentação do DNA e integridade da membrana (TORRES *et al.*, 2024). Tais danos são geralmente atribuídos a fatores como estresse osmótico, térmico e oxidativo, que comprometem a qualidade espermática após o descongelamento (MARTINEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012; ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2020).

Neste estudo, os percentuais de integridade do DNA foram inferiores quando comparado com outros estudos sobre o sêmen de curimatã. O controle apresentou uma média de $38,80 \pm 11,26\%$ de DNA intacto, enquanto a concentração de 15% de metanol exibiu $59,90 \pm 16,24\%$ de DNA intacto. Valores acima de 80% foram observados para o sêmen de *P. brevis* utilizando o DMSO como crioprotetor controle (NASCIMENTO *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2021). A integridade do DNA é um parâmetro fundamental para a sobrevivência e o desenvolvimento dos embriões de peixes (FIGUEROA *et al.*, 2018). Embora o DNA tenha a capacidade de se reparar em casos de fragmentação, o grau de reparo depende da extensão do dano e da qualidade do gameta (TAMBURRINO *et al.*, 2012). Portanto, a avaliação dos danos

ao DNA após a criopreservação permite melhorar os protocolos de criopreservação, otimizando-os para reduzir as criolesões da cromatina (CARTÓN-GARCÍA *et al.*, 2013). Nesse contexto, os baixos percentuais de DNA íntegro obtidos neste estudo podem estar relacionados ao processo de criopreservação, uma vez que o uso dos crioprotetores não demonstrou efeitos significativamente relevantes.

Varela-Junior *et al.* (2012) testaram diferentes amidas (DMF) na criopreservação do espermatozoide de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em comparação com crioprotetores mais convencionais como o DMSO e glicerol. Os autores observaram altas taxas de DNA íntegro nas concentrações de 5% e 8% de dimetilformamida, com médias de $73,1 \pm 4,2\%$ e $64,6 \pm 3,0\%$, obtendo também a melhor qualidade espermática pós-descongelamento para a espécie. Ao analisar a ação desse crioprotetor no sêmen de curimatã (*P. brevis*), os percentuais de DNA íntegro foram menores, alcançando média de $35,50 \pm 17,63\%$ na concentração de 5%, evidenciando a baixa eficácia desse crioprotetor na manutenção da qualidade do DNA dos espermatozoides pós-descongelados de *P. brevis*.

Neste estudo, a avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides revelou que o tipo de crioprotetor e suas concentrações influenciaram a manutenção da estrutura celular dos espermatozoides pós-descongelamento (Tabela 3). O grupo controle apresentou média de membrana íntegra de $55,00 \pm 10,45\%$, enquanto a adição de dimetilformamida (DMF) a 5% resultou no menor percentual de integridade da membrana, com apenas $16,33 \pm 2,69\%$ ($P < 0,05$). O metanol também apresentou desempenho inferior quando comparado ao controle ($P < 0,05$), com médias de $22,50 \pm 3,51\%$ e $24,25 \pm 8,98\%$ nas concentrações de 10% e 15%, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de etilenoglicol (5%, 10% e 15%) em comparação com o controle ($P > 0,05$).

Na presente pesquisa, observou-se que o etilenoglicol, em comparação aos demais crioprotetores, protegeu melhor as membranas citoplasmáticas dos espermatozoides, o que também foi constatado por Almeida-Monteiro *et al.* (2020) para o sêmen vitrificado de *P. brevis*. A ação desse crioprotetor está relacionada à sua alta capacidade de penetração, que reduz as concentrações de sais no sêmen e atenua os efeitos deletérios nas estruturas dos espermatozoides (MORAES, 1996). Além disso, o etilenoglicol proporciona maior estabilidade às estruturas lipídicas da membrana espermática e protege as células contra alterações causadas pelo choque térmico (MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977). Assim, sugere-se que esse efeito possa ter influenciado para a manutenção da membrana celular, embora tenha apresentado desempenho inferior em outros parâmetros de qualidade espermática.

Estudos anteriores conduzidos com o sêmen de curimatã, observaram taxas de integridade da membrana similares as obtidas no presente estudo para o DMSO, com percentuais de $56,15 \pm 3,46\%$, $63,58 \pm 6,95\%$, $63,08 \pm 1,92\%$ (NUNES *et al.*, 2016; 2019; ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2019). Esses resultados, em comparação aos demais tratamentos, foram superiores aos obtidos no presente estudo. Quando observado o sêmen fresco, observa-se que houve uma redução significativa na integridade de membrana, especialmente na concentração de 5% de dimetilformamida, com média de $16,33 \pm 2,69\%$.

É importante considerar que a qualidade inicial do sêmen tem influência nos resultados espermáticos após o descongelamento. De acordo com Solis-Murgas *et al.* (2011) diversos fatores podem influenciar as características do sêmen, como o estado nutricional dos animais, peso, tipo e dosagem hormonal, clima, época de desova, entre outros. Além disso, a diminuição da qualidade do esperma pode ocorrer durante manuseio e armazenamento do sêmen, que levam a danos na estrutura celular, perda de integridade da membrana e fragmentação do DNA. Contudo, segundo Silva (2024), mesmo utilizando o material seminal de qualidade inferior, a criopreservação ainda é uma boa alternativa para a preservação de material genético de espécies em ameaçadas, como o *P. brevis*.

De maneira geral, esta pesquisa foi a primeira a investigar o efeito da dimetilformamida em diferentes concentrações no sêmen criopreservado de curimatã comum (*P. brevis*). Com base nos resultados observados, houve um baixo desempenho da dimetilformamida em quase todos os parâmetros analisados, com menor efeito protetor nas concentrações de 5% e 15%. Além disso, foi possível identificar uma interação significativa entre os crioprotetores e suas concentrações na qualidade espermática de *P. brevis*. O metanol na concentração de 10%, associado a 5% de glicose, demonstrou eficácia na manutenção da motilidade (incluindo o VCL e VAP) após o descongelamento, superando o tratamento controle com DMSO, que, conforme registrado por Nunes *et al.* (2016), é considerado o melhor meio de congelamento para o curimatã comum. Em relação aos outros parâmetros, o metanol manteve-se com médias semelhantes aos outros tratamentos. Embora os espermatozoides tenham apresentado baixa motilidade com o etilenoglicol, os percentuais de membrana íntegra e DNA foram semelhantes ao controle (DMSO).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que, dentre os crioprotetores testados, o meio com 10% de metanol associado a glicose 5% é uma alternativa promissora ao uso de DMSO durante criopreservação seminal de *P. brevis*. Essa solução promoveu melhores resultados na cinética e morfologia espermática pós-congelação. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para identificar seu mecanismo de ação e efeitos sobre as integridades da membrana plasmática e do DNA espermático. Tal conhecimento subsidiará a adoção de medidas que previnam danos a essas estruturas, aumentando o potencial desse crioprotetor em alternância ao DMSO.

REFERÊNCIAS

- AMANN, Rupert P.; KATZ, David F. Andrology lab corner: Reflections on casa after 25 years. **Journal of andrology**, Hoboken, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.
- ALAVI, Sayyed Mohammad Hadi; COSSON, Jacky. Sperm motility in fishes. **Journal of Fish Biology**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 75-100, 2006.
- ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva et al. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 2669-2679, 2017.
- ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva et al. Sperm vitrification of *Prochilodus brevis* using Powder Coconut Water (ACP-104) in association with different cryoprotectant concentrations. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 51, n. 11, p. 4565-4574, 2020.
- ARAÚJO, Rafael Venâncio de. **Motilidade, Velocidade e Fertilidade do sêmen de Surubim-do-paiaíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores**. 2011. 91p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2011.
- ASTURIANO, Juan F.; CABRITA, Elsa; HORVÁTH, Ákos. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and comparative endocrinology**, San Diego, v. 245, p. 69-76, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>.
- BLAXTER, John Howard S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, Londres, v. 172, n. 4391, p. 1189-1190, 1953.
- BUSTAMANTE GONZÁLEZ, Jesús Dámaso; RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Martha; CORTÉS GARCÍA, Araceli; ARENAS RÍOS, Edith; FIGUEROA LUCERO, Gerardo; ÁVALOS RODRÍGUEZ, Alejandro. Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleósteos. **AquaTIC**, Espanha, n. 53, p. 1-17, 2019.
- ARAÚJO, Sandra Amaral; GURGEL, Hélio de Castro Bezerra. Aspectos da biologia de *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2002.
- CABRITA, Elsa; ROBLES, Vanesa; HERRÁEZ, María Paz. Methods in fish gametes cryopreservation. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 47, n. 3, p. 248-264, 2010.
- CABRITA, Elsa; ROBLES, Vanesa; HERRÁEZ, María Paz. Gamete quality and its impact on aquaculture. **Aquaculture Research**, Hoboken, v. 45, n. 1, p. 121-134, 2014.
- CARTÓN-GARCÍA, Fernando; RIESCO, María Fernanda; CABRITA, Elsa; HERRÁEZ, María Paz; ROBLES, Vanesa. Quantification of lesions in nuclear and mitochondrial genes of *Sparus aurata* cryopreserved sperm. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 402 - 403, [s. n.], p. 106-112, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.034>.

CAROLSFELD, John; HARVEY, Brian J.; GODINHO, Heraldo Pereira; ZANIBONI-FILHO, Edson. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-481, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.

COSTA, Roberta Barbosa; SALES, Ricardo de Oliveira; MAGGIONI, Rafael; VIDAL, Danilo Vidal.; FARIAS, José Otávio. Estudo preliminar na indução reprodutiva da curimatã comum (*Prochilodus cearensis* steindachner, 1911). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, São Paulo, v. 06, n. 2, p. 77-91, 2012. DOI: 10.5935/1981-2965.20120008.

DOURADO, Otávio Ferreira; CHACON, José de Oliveira; DAVIES, William. Idade e crescimento da curimatã comum *Prochilodus cearensis* Steindachner, no açude “Pereira de Miranda”, Pentecoste, Ceará, Brasil. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 29, n. 2, p. 1-118, 1971.

DOURADO, Otávio Ferreira. Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo DNOCS. Fortaleza, Convênio SUDENE/DNOCS, 1981., [s. l.], 40p.

ELLIOTT, Gloria D.; WANG, Shangping; FULLER, Barry J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, Amsterdã, v. 76, [s. n.], p. 74-91, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>.

FATIMAH, Noor; AZIZ, Nor Azizah; AZMI, Nor Ibrahim. Effects of antioxidants in diluents for cryopreservation of fish sperm: A review. **Journal of Aquaculture Science**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 58-70, 2021.

FAO. Cryopreservation in aquatic species: progress and application. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/4/i3017e/i3017e00.pdf>.

FERNÁNDEZ, José Luis et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 883-842, 2005. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089.

FIGUEROA, Elias. et al. 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**, Amsterdã, v. 493, n. 1, p. 1-8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.046>.

FIGUEROA, Elias; 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**, Hoboken, v. 89, n. 3, p. 1537–1550, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfb.13052>.

GURGEL, Liliane de Lima; VERANI, José Roberto; CHELLAPPA, Sathyabama. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2012, n. 1, p. 810532, 2012. DOI: 10.1100/2012/810532.

GONÇALVES, Luan Carlos; SANTOS, José Maria dos; PEREIRA, Robson Rodrigues. Avaliação morfológica de espermatozoides de peixes criados em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 42, n. 3, p. 102-109, 2018.

HOLT, William Vincent. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Amsterdã, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3).

KOWALSKI, Robert; ZAKRZEWSKI, Michał; CIESIELSKI, Sebastian. Natural antioxidants as additives in fish sperm cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdã, v. 93, (s. n.), p. 84-90, 2020.

JORDANA, Sampaio Leite; OLIVEIRA-ARAÚJO, Mayara Setúbal; ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva de; CAMPELLO, Ana Cláudia Nascimento Campos; Salmito-Vanderley, C. S. B. Seasonal variation in seminal quality in Brazilian bocachico (Teleostei, Characiformes). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 3, p. 759-766, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n326rc.7>

LEZCANO RÍOS, Magda Angélica. Evaluación de cuatro agentes crioprotectores en la criopreservación de espermatoforos, masa y suspensión espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). 2001. 115 f. (Trabalho de conclusão de curso) - Graduação em Biologia Marinha, Universidade de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 2001.

LOPES, José Tadeu et al. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 3, n. 3, p. 170-175, 2014.

LIMA, Anderson Carlos *et al.* Indução hormonal e manejo hídrico no aprimoramento da reprodução de *Prochilodus brevis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 4, [s. n.], p. 2901-2910, 2021.

LIU, Jing *et al.* Antioxidant supplementation enhances sperm cryopreservation outcomes in aquaculture species. **Cryobiology**, Amsterdã, v. 98, [s. n.], p. 15-22, 2022.

MARIA, Alexandre Nizio. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de. pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARIA, Alexandre Nizio; AZEVEDO, Hymerson Costa; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, Marcos (org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá, AP, Embrapa Amapá**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 47-63.

MARIA, Alexandre Nizio; CARNEIRO, Paulo César Falanghe. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência animal**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARTÍNEZ-PARRA, José; SÁNCHEZ-RAMOS, José Francisco; TORRES, Rafael. Influence of pollutants on fish sperm morphology and reproduction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 40, n. 3, p. 567–578, 2021.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, Sonia; HORVÁTH, Ákos; LABBÉ, Catherine; ZHANG, Tiantian, ROBLES, Vanesa; HERRÁEZ, Paz; SUQUET, Marc; ADAMS, Serean; VIVEIROS, Ana; TIERSCH, Terrence; CABRITA, Elsa. Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 472, p. 156-177, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>.

MERYMAN, Harold; WILLIAMS, Robert; DOUGLAS, Mary St John. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdã, v. 14, n. 3, p. 287–302, 1977. DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90177-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90177-8).

MILIORINI, Alésio Batista; MURGAS, Luis David Solis; ROSA, Priscila Vieira; OBERLENDER, Guilherme; PEREIRA, Gilmar Junqueira Machado; COSTA, Diego Vicente. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 177 - 187, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x>.

MORAES, Cácio do Nascimento. Métodos alternativos para congelação, descongelação e avaliação do sêmen ovino em pellets. **Ciência Rural**, v. 26, [s. n.], p. 349-350, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781996000200032>.

MOREIRA, Suzany Iasnaya Lopes. Estrutura populacional do *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) (Characiformes, Prochilodontidae) em sistema de reservatórios de uma bacia hidrográfica do semiárido neotropical. 2015. 57f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

MORALES, Julio **Aquicultura Marina Animal**. 1. ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1986.

NAKATINI, Keshiyu *et al.* **Ovos e larvas de peixes de água doce – Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. Brasília: DF, FAO/CODEVASF – CNPq, 1983.

NASCIMENTO, Márcia Maria; NASCIMENTO, Wallace Silva; CHELLAPPA, Naithirithi; CHELLAPPA, Sathyabama. Biologia reprodutiva do curimatã comum, *Prochilodus brevis* (Characiformes:Prochilodontidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 2, n. 2, p. 31-43, 2012.

NASCIMENTO, Renata Vieira; LEITE-CASTRO, Liliane Veras; MONTENEGRO, Assis Rubem; OLIVEIRA-ARAÚJO, Mayara Setubal; LOPES, Júlia Trujilio; ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva; FERREIRA, Yasmin Maia; SALMITO-VANDERLEY, Carminda Sandra Brito. Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 45, p. 1-9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80488>.

NASCIMENTO, Antonio Ferreira; MARTINS, Felipe Tadeu; SILVA, João Francisco. Manejo reprodutivo em peixes: impactos da manipulação sobre a qualidade seminal. **Revista de Aquicultura e Conservação**, Fortaleza, v. 15, n. 2, p. 58-67, 2020.

NEYRÃO, Iuri Moraes. Criopreservação em sêmen de peixes: revisão de protocolos experimentais e novas percepções. 2022. 157f. Tese (Doutorado em Produção Animal), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2022.

NICOLETI, Eduardo Thomé. Desenvolvimento de um protocolo de criopreservação seminal de *Leiarius marmoratus*. 2024. 72f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2024.

NUNES, Larissa Teixeira; OLIVEIRA-ARAÚJO, Mayara Setubal; LOPES, Júlia Trugilo; SOUZA, Maria Eduarda Magalhães; PINHEIRO, Romulo Roberto Ribeiro; CAMPELLO, Cláudio Cabral; SALMITO-VANDERLEY, Carminda Sandra Brito. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 1643- 1654, 2016. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n3p1643.

NUNES, Larissa Teixeira; OLIVEIRA-ARAÚJO, Mayara Setubal; LOPES, Júlia Trugilo; ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva; NASCIMENTO, Renata Vieira; PEREIRA, Vanessa Alves; SALMITO-VANDERLEY, Carminda Sandra Brito. Fertilizing capacity of the cryopreserved sperm of *Prochilodus brevis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 47, n.1, p.1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.92791>.

OLIVEIRA-ARAÚJO, Mayara Setubal; ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva; NUNES, Larissa Teixeira; LINHARES, Francisco Renan Aragão; PINHEIRO, João Paulo Silva; PINHEIRO, Romulo Roberto Ribeiro; FERREIRA, Oliveira Ferreira; CAMPELLO, Claudio Cabral; SALMITO-VANDERLEY, Carminda Sandra Brito. Cryopreservation of tambaqui semen using a dry shipper and a programmed freezing machine. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 2167-2180, 2016.

PEGG, David E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, John; Mark R. McLellan (Org.). **Methods in Molecular Biology: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc., v. 368, p. 39-58, 2007.

PEGG, David E. Principles of cryopreservation. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**, p. 3-19, 2015.

PERRY, Carolina Trindade; CORCINI, Carine Dahl; ANCIUTI, Andreia Nobre; OTTE, Marina Vianna; SOARES, Sara Lorandi; GARCIA, Juan Ramon Esquivel; MUELBET, Juan Ramon Esquivel; JUNIOR, Antonio Sergio Varela. Amides as cryoprotectants for the freezing of *Brycon orbignyanus* sperm. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 508, p. 90-97, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.015>.

PÉREZ-CEREZALES, Serafín; MARTÍNEZ-PÁRAMO, Sonia; BEIRÃO, José; HERRÁEZ, Marcos. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. **Theriogenology**, Estados Unidos, v. 74, p. 282-289, 2010. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.012.

PORTO, H. L. R. A curimatã comum, *Prochilodus cearenses* Steindachner (1911), nos açudes do Nordeste: Biologia e pesca. **Cadernos de Pesquisa**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 93-129, 1987.

RURANGWA, Eugène; KIME, David; OLIVEIRA, Frans; NASH, Jon P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdã v. 234, n. 1, p. 1- 28, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>.

SALMITO-VANDERLEY, Carmina Sandra Brito; VIEIRA, Marcelo José da Ascensão Feitosa; LEITE, Liliane Veras; OLIVEIRA, Fátima de Cássia Evangelista; LINHARES, Renan Aragão; SALGUEIRO, Cristiane Clemente de Mello; NUNES, José Ferreira. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, [s. l.], v.22, n.1, p.255-268, 2012.

SALMITO-VANDERLEY, Carmina Sandra Brito. Cryopreservation of tambaqui semen using programmed freezing machine and dry shipper. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 2167- 51, 2016.

SILVA, Daniel Vasconcelos. Polissacarídeos extraídos da microalga *Arthospira platensis* na congelamento de sêmen de *Prochilodus brevis* (Actinopterygii). 2024. 54f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 2024.

SILVA, Flavia Cristina de Paula; BRITO, Marcelo Fulgêncio Guedes; FARIAS, Luiz de Macedo; NICOLI, Jacques Robert. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. **Journal of Fish Biology**, Vancouver, v.67, p.1686-1698, 2005.

STREIT, Danilo P.; RODRIGUES, Rômulo Batista; SANCHES, Eduardo Antônio; POVH, Jayme Aparecido; SIQUEIRA-SILVA, Diógenes Henrique; VASCONCELOS, Ana Carina Nogueira; ZHANG, Tiantian. Sperm Cryopreservation Protocols for Neotropical South American Species. In: STREIT, Danilo P.; ZHANG, Tiantian; Paredes, Stefania (Org.). **Cryobiology for South American Neotropical Fish Species**, [s. l.]: CRC Press, 2024. p. 193-219.

SOLIS-MURGAS, Luis David; FELIZARDO, Viviane Oliveira; FERREIRA, Mônica Rodrigue; ANDRADE, Estefânia de Souza; VERAS, Galileu Crovatto. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Revista Brasileira De Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186–191, 2011.

TAITSON, Paulo Franco.; CHAMI, E.; GODINHO, Hugo Pereira. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. **Animal reproduction science**, Belo Horizonte, v. 105, n. 3-4, p. 283-291, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.009>.

TAMBURRINO, Lara; MARCHIANI, Sara; MONTROYA, Margarita; MARINO, Francesco Elia; NATALI, Ilaria; CAMBI, Marta; FORTI, Gianni; BALDI, Elisabetta; MURATORI, Monica. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. **Asian. J. Androl**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 24-31. DOI: <https://doi.org/10.1038/aja.2011.59>

TAYLOR, Brad W.; FLECKER, Alexander S.; HALL, Robert O. Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. **Science**, [s. l.], v. 313, n. 5788, p. 833-836, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1128223>

TORRES, Thais Maia; ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva; NASCIMENTO, Renata Vieira; PEREIRA, Vanessa Alves; FERREIRA, Yasmim Maia; LOBATO, Jessica Sales; PINHEIRO, Romulo Roberto Ribeiro; SALES, Yara Silvino; MONTENEGRO, Assis Rubens; SALMITO-VANDERLEY Carminda Sandra Brito. Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using different concentrations of non-permeable cryoprotectants. **Animal Reproduction**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. e20210083, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0083>.

TORRES, Thais Maia; ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva; NASCIMENTO, Renata Vieira; CÂNDIDO-SOBRINO, Silvio Alencar.; SOUSA, Carla Tatiana Nascimento; FERREIRA, Yasmim Maia; PAULA, Kamila Teixeira; SALMITO-VANDERLEY Carminda Sandra Brito. Effects of taurine, cysteine and melatonin as antioxidant supplements to the freezing medium of *Prochilodus brevis* sperm. **Cryobiology**, Amsterdã, v. 114, p. 104858, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104858>.

VARELA JUNIOR, Antônio Sergio; CORCINI, Carine Dahl; GHELLER, Stela Mari Meneghello; JARDIM, Rodrigo Desessards; LUCIA JR Thomaz; STREIT JR, Danilo P.; FIGUEIREDO, Mário Roberto Chim. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, Estados Unidos, v. 78, n. 2, p. 244-251, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029>.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça; GODINHO, Hugo Pereira. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 35, p. 137-150, 2009.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: TIERSCH, T. R.; GREEN C. C. (Org.). **Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2011. p. 387-397.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça; NASCIMENTO, Ariane F.; LEAL Marcelo C.; GONÇALVES; Antônio C. S.; ÓRFÃO Laura H.; COSSON, Jackey. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 193-201, 2015.

YANG, Huiping; E Hu.; BUCHANAN, Jhon T.; TIERSCH, Terrence R. A Strategy for sperm cryopreservation of Atlantic salmon, *Salmo salar*, for remote commercial-scale high-throughput processing. **Journal of the World Aquaculture Society**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 96-112, 2018.

YANG, Sen; GUAN, Jingjing; HUA, Yanglin. Optimization of sperm cryopreservation protocol for Basa catfish (*Pangasius bocourti*). **Cryobiology**, [s. l.], v. 111, p. 89-95, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.04.001>.

ZANIBONI-FILHO, Evoy; BALDISSEROTTO, Bernardo. Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Revista Brasileira Reprodução Ani**, [s. l.], v. 39, n.1, p.189-194, 2015.

ZENG, Qianqian; CHEN, Yixuan; WANG, Minyi; LI, Yinggang; DAI, Tao; QIN, Weiling; ZHU, Yating; ZHANG, Chun; ZHOU, Yi; QIN, Qinbo; YANG, Conghui; GU, Qianhong. Study on sperm cryopreservation of hybrid fish derived from *Carassius cuvieri* × *Carassius auratus* red var. **Reproduction and Breeding**, [s. l.], v. 4, p. 234–242, 26 set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbre.2024.09.002>.