

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Açúcares e amidas na criopreservação espermática do *Prochilodus lineatus*.

Izani Bonel Acosta

Pelotas, 2019

Izani Bonel Acosta

Açúcares e amidas na criopreservação espermática do Curimba, *Prochilodus lineatus*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A185a Acosta, Izani Bonel

Açúcares e amidas na criopreservação espermática do Curimba, *Prochilodus lineatus* / Izani Bonel Acosta ; Antonio Sergio Varela Junior, orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas, 2019.

53 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Curimba. 2. Crioprotetores. 3. Açúcares. 4. Amidas. 5. Criopreservação. I. Varela Junior, Antonio Sergio, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Título.

CDD : 639.2

Izani Bonel Acosta

Açúcares e amidas na criopreservação espermática do *Prochilodus lineatus*.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/12/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Orientador)
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Rio Grande.

Dr. Charles Nunes Fróes
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Rio Grande.

Dra. Stela Mari Meneghello Gheller
Doutora em Ciências Animal pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Rafael Aldrighi Tavares
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Aos meus filhos, amores da minha vida, Juan e Carolina agradeço pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor, e por terem acompanhado com amor e paciência esse momento, dando-me a certeza de que todo esforço vale a pena.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo companheirismo, por todos os momentos que estive ausente e por todos aqueles que tivestes que ser pai e mãe dos nossos tesouros. Obrigada por acreditar em mim.

À minha Mana Josiane, que sempre me incentivou. Devo muito a você esse momento!!

Dedico aos meus sogros Ieda e Jose Arnaldo, que sempre me apoiaram. Minha sogra meu carinhoso obrigada por todos os dias e noites que com sua incansável dedicação e ternura zelou pelos meus, pelos “nossos filhotes”.

Meus sinceros e carinhosos agradecimentos ao meu orientador Dr. Antonio Sergio Varela Juniore e co-orientadora Dra. Carine Corcini por dividir comigo seus conhecimentos, pela confiança, pela oportunidade, e principalmente pelo crescimento profissional.

Aos colegas do Repropel pela ajuda, pelas conversas, cafés e discussões de artigos.

As queridas amigas Stela e Camila, sou grata pela amizade que construímos durante esses anos. Obrigada gurias!!

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, pela oportunidade de obter o título de doutor. A Capes/Cnpq pela bolsa de Doutorado, possibilitando a execução e realização deste estudo.

A Deus, por conceder a benção de poder concluir mais esta etapa, dando-me sabedoria nas escolhas e força para continuar.

Resumo

ACOSTA, Izani Bonel. **Açúcares e amidas na criopreservação espermática do Curimba, *Prochilodus lineatus***. 2020. 53f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O objetivo desse estudo foi avaliar as amidas dimetilsulfóxido (DMSO 10%), dimetilformamida (DMF) e dimetilacetamida (DMA) nas concentrações de 2, 5, 8 e 11 %, bem como os açúcares trealose, sacarose, lactose e rafinose nas concentrações de 0, 50, 100, 150 mM, como agentes crioprotetores no esperma da espécie *Prochilodus lineatus*. O esperma desses animais foi coletado através de massagem abdominal, sendo induzidos hormonalmente com extrato de hipófise de carpa 12h antes da extrusão. Em seguida, as amostras coletadas foram diluídas nos diferentes tratamentos e após foram congeladas. Pós-descongelamento foram feitas análises de cinética celular pelo Computer Assisted Semen Analysis - CASA (período de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, motilidade total e progressiva), análise bioquímica e das organelas celulares: Índice de fragmentação do DNA (DFI), integridade de membrana, funcionalidade mitocondrial, fluidez de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e oxidação lipídica, através de citometria de fluxo. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro – Wilk, com posterior análise de variância através do teste de Kruskal Wallis, devido os dados não se comportarem de forma paramétrica. No trabalho com as amidas constatamos que DMF nas concentrações 2, e 8 % são eficientes como crioprotetores, com respostas melhores que o controle (DMSO 10%). No experimento com açúcares, o parâmetro período de motilidade na concentração de 100 mM da trealose mostrou resultados superiores ao controle, diferindo estatisticamente. Os açúcares sacarose, lactose e rafinose não mostraram-se eficientes para criopreservação de curimba, apresentando resultados que não foram estatisticamente diferentes do controle (DMSO10%).

Palavras-chave: curimba; crioprotetores; açúcares; amidas; criopreservação.

ABSTRACT

ACOSTA, Izani Bonel. **Sugars and amides in the sperm cell cryopreservation of Curimba, *Prochilodus lineatus***. 2019. 60p. Thesis (Doctorate in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The aim of this study was to evaluate dimethylsulfoxide (DMSO 10%), dimethylformamide (DMF) and dimethylacetamide (DMA) amides at concentrations of 2, 5, 8 and 11%, as well as trehalose, sucrose, lactose and raffinose sugars at 0, 50, 100, 150 mM, as cryoprotective agents in *Prochilodus lineatus* semen. The semen of the animals was collected through abdominal massage, being hormonally induced with carp pituitary extract 12h before extrusion. Then, the collected samples were diluted in the different treatments and then frozen. Post-thawing cell kinetics analyzes were performed by Computer Assisted Semen Analysis - CASA (motility period, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, total and progressive motility). Biochemistry and cell organelles: DNA fragmentation index (DFI), membrane integrity, mitochondrial functionality, membrane fluidity, reactive oxygen species (ROS) production and lipid oxidation by flow cytometry. Shapiro - Wilk normality test was performed, with subsequent analysis of variance through the Kruskal Wallis test, due to the fact that the data did not behave in a parametric way. In the work with amides we found that DMF at concentrations 2 and 8% are efficient as cryoprotectants, with better responses than control (DMSO 10%). In the sugar experiment, the motility period parameter at 100 mM trehalose concentration showed superior results to the control, differing statistically. Sucrose, lactose and raffinose sugars were not efficient for curimba cryopreservation, presenting results that were not statistically different from the control (DMSO10%).

Keywords: curimba, cryoprotectants, sugars, amides, cryopreservation.

Lista de Figuras

Figura 1	Peixe <i>Prochilodus lineatus</i>	13
Figura 2	Cascata dos eventos desencadeadores da motilidade espermática.....	16

Artigo 1

Figura 1	Effect of different concentrations of dimethylformamide (DMF) and dimethylacetamine (DMA), at concentrations 2, 5, 8, 11%, over the fertility rate of cryopreserved Currimba (<i>P. lineatus</i>) semen samples.....	27
----------	--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Principais agentes crioprotetores.....	18
----------	--	----

Artigo 1

Tabela 1	Effect of different concentrations of dimethylformamide (DMF), dimethylacetamine (DMA) at concentrations of 2, 5, 8, 11% and dimethylsulfoxide (DMSO) at 10% concentration in <i>P. lineatus</i> semen samples, cryopreserved, with respect to the parameters DNA integrity, Mitochondrial Integrity (MI) and membrane integrity (Memb Int). Results in percentage (mean \pm standard deviation of the mean). (n=5)	26
Tabela 2	Effect of different concentrations of dimethylformamide (DMF), dimethylacetamine (DMA) at concentrations of 2, 5, 8, 11% and dimethylsulfoxide DMSO at 10% concentration in cryopreserved semen samples from <i>P. lineatus</i> over the parameters of motility rate and motility time. Results expressed in percentage (mean \pm standard deviation of the mean). (n=5).....	26

Artigo 2

Tabela 1	Análise dos parâmetros da funcionalidade celular e motilidade das organelas sob influência do açúcar trealose e sacarose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média	44
Tabela 2	Análise dos parâmetros da cinética espermática das organelas sob influência do açúcar trealose e sacarose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média	45

Lista de Abreviaturas e Siglas

BTS	Beltsville Thawing Solution
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CFDA	Carboxifluorsceína
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FICT	Lectin Conjugate
H	Horas
IA	Inseminação Artificial
IP	Iodeto de Propídio
Kg	Quilograma
LIN	Linearity
Mg/ml	Miligrama por ml
MIN	Minuto
mM	Milimolar
n	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
PBS	Buffer salina fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
Rh 123	Rodhamine
SisBi/UFPel	Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Pelotas
TMO	Total motility
ul	Microlitro
VAP	Velocity average path
VCL	Velocity curved line
VSL	Velocity straight line

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
©	Copyright
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

Sumário

1 Introdução	11
2 Revisão da Literatura	13
2.1 A espécie em estudo	13
2.2 Aspectos Reprodutivos	14
2.3 Aspectos Espermáticos	14
2.4 Criopreservação espermática de Peixe	16
2.5 Crioprotetores	17
3 Artigos	20
3.1 Artigo 1	20
3.2 Artigo 2	32
4. Considerações Finais	47
5. Referências Bibliográficas	47

1 Introdução

O desenvolvimento de protocolos para criopreservação de esperma de peixe é intenso, pois o esperma congelado favorece sua manipulação, permitindo flexibilidade no período reprodutivo auxiliando programas de reprodução assistida de peixes nativos (CABRITA et al., 2011), bem como aumenta o tempo em que as amostras de espermatozóides podem ser manipuladas (MAGNOTTI et al., 2018). Outro fator importante que se beneficia com a crescente procura por novos e melhores protocolos é a recuperação ou amplificação da ictiofauna por meio de criobancos genéticos (ASTURIANO et al., 2016).

No entanto um dos grandes problemas da criopreservação são as crioinjúrias constatadas durante todo o processo, já que os espermatozóides de peixes podem ser influenciados por fatores como diluentes, agentes crioprotetores, tempo de estabilização, taxa de congelamento e temperaturas de degelo (AHN et al., 2018). Crioprotetores são categorizados como permeáveis e não permeáveis conforme sua eficiência em penetrar ou não nas membranas celulares. Entre os agentes crioprotetores permeáveis mais citados estão dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol e o não permeáveis são sacarose, glicose, lactose, rafinose e trehalose (ELLIOTT et al., 2017). Este agente crioprotetor é um soluto que, quando presente no meio celular, auxilia na recuperação pós-degelo mostrando resultados superiores àqueles que não contem crioprotetor (DIOGO et al., 2019).

A busca pelo melhor protocolo, tem como objetivo principal encontrar um crioprotetor, cuja sua concentração amenize os danos causados durante e após o congelamento do esperma, pois a qualidade desses gametas são importantes para continuidade íntegra de uma determinada espécie. O curimba (*Prochilodus lineatus*) é um peixe teleosteo neotropical de água doce, que vem se destacando atualmente pelo interesse científico e comercial devido suas características biológicas. É uma espécie de peixe teleosteo neotropical de água doce amplamente distribuído nos rios da América do Sul, onde representa um peixe bentônico ecologicamente e economicamente importante (BARROCA et al., 2015).

Apresenta métodos de reprodução artificial bem estabelecido, com altas taxas de reprodução, assim tornou-se uma espécie utilizada como modelo para a pesquisa com reprodução de peixes (PAULA et al., 2014, MILIORINI et al., 2011, FAI et al., 2017).

A criopreservação espermática de peixe tornou-se uma biotecnologia de conservação de espécies de interesse comercial e ambiental, tendo como papel chave os agentes crioprotetores que propiciam as células espermáticas um armazenamento em temperaturas criogênicas por longos períodos e uma recuperação em condições funcionais. Para que as estruturas dos espermatozoides permaneçam intactas, se faz necessário mais estudos, para criação de protocolos que tragam resultados positivos das estruturas celulares pós-descongelamento.

Nesse contexto o presente estudo tem como objetivo investigar o efeito de alguns crioprotetores internos (dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, dimetilformamida) e externos (sacarose, lactose, trealose e rafinose) com o intuito de desenvolver protocolos eficientes para criopreservação do esperma da espécie *Prochilodus lineatus* (Curimba).

2 Revisão da Literatura

2.1 A espécie em estudo

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Prochilodontidae;

Subfamília: Prochilodontinae:



Figura 1 – Peixe Curimba (*Prochilodus lineatus*)

O *Prochilodus lineatus* denominado “curimba” ou “curimbatá” é um peixe neotropical que pertence à família Prochilodontidae sua distribuição é limitada às bacias hidrográficas dos rios La Plata e Paraíba do Sul (ESCHMEYER ET AL., 2016). O tamanho máximo relatado do curimba é de 78 cm e atinge a primeira maturação entre 24 e 28 cm com importância ecológica e comercial (MACHADO et al., 2019).

Considerada o mais comum do Pantanal, é uma espécie reofílica, com característica que os tornam importantes em sistemas de policultivo, pois realizam a limpeza dos tanques. O desenvolvimento de biotecnologias tem sido incentivado não apenas com o propósito de preservar, mas também pelo fato de suas larvas serem utilizadas como alimento “forrageiro” para espécies carnívoras na fase larval, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), o dourado (*Salminus brasilienses*) e o jaú (*Zungaro jahu*) (MURGAS et al., 2012).

Como é uma espécie migratória, o curimba precisa nadar rio acima para desovar e esse ciclo foi drasticamente afetado devido pela ação antrópica (PAULA et al., 2012), desta forma a criopreservação é uma maneira para sua conservação, bem como um instrumento para auxílio no repovoamento de rios e lagos.

2.2 Aspectos Reprodutivos

O conhecimento das estruturas reprodutivas dos peixes é importante, pois assim é possível adotar técnicas que maximizem a produção e auxilie nos estudos com repovoamento. As características no comportamento reprodutivo das diferentes espécies geralmente estão relacionadas com a adaptação, ou seja, a chance de aumentar a sobrevivência das larvas (GERBER et al., 2014).

O curimba se reproduz na cabeceira dos rios de novembro a janeiro, na época das chuvas, este animal é comumente utilizado como modelo biológico para estudos sobre criopreservação principalmente por possuir rápido desenvolvimento embrionário, ovos não adesivos, um grande espaço perivitelino e uma grande gema (NINHAUS-SILVEIRA, 2008). A espécie apresenta características migratórias para reprodução em ambiente natural, sendo que sua desova ocorre durante um período que se estende de novembro a janeiro, apresentando o tipo total de desova, podendo desovar entre 500.000 a 1.200.000 óvulos, não apresentando cuidado parental, com larvas e juvenis que se desenvolvem em lagos de várzea (AGOSTINHO et al., 2003). Já em cativeiro, o curimba necessita de indução hormonal para se reproduzir (Paula et al., 2014).

Entre os interesses por esta espécie podemos ressaltar o decréscimo do estoque de peixes de piracema, por conta da construção de hidrelétricas, isolamento de populações, urbanização, sobrepesca, captura em períodos de desova e introdução de espécies exóticas nos rios, justificando a importância em conservar a biodiversidade desse animal (CAROLSFELD et al., 2003).

2.3 Aspectos Espermáticos

As características espermáticas variam muito entre as espécies de peixes e a sua avaliação é de grande importância para promover a fertilização artificial (MURGAS et al., 2011). Ao contrário dos mamíferos, o espermatozoide da maioria dos peixes

não possui motilidade no plasma seminal dentro do testículo, necessitando de um meio aquoso de baixa osmolalidade para sua ativação.

O espermatozóide de peixes teleósteos é dividido em três compartimentos principais: a cabeça, onde se encontra o núcleo com o DNA, a peça intermediária composta pela mitocôndria que fornece energia para o batimento flagelar, e o flagelo que é responsável pelo movimento espermático (LAHNSTEINER & PATZNER, 2008). Não possui acrossoma como nos mamíferos, o qual é compensada pela presença da micrúpila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (COSSON 2004).

O esperma é composto pelo plasma seminal e células espermáticas. Em peixe o esperma é, composto pelas células espermáticas e pelos fluidos produzidos no próprio testículo, podendo sua composição variar de indivíduo para indivíduo, apresentando uma interação entre fatores ambientais, genéticos e fisiológicos (RURANGWA et al., 2004). Sua composição é constituída principalmente por compostos minerais como magnésio, cálcio, potássio e sódio, sendo os dois últimos diretamente relacionados com a imobilidade dos espermatozoides no plasma (CIERESZKO et al., 2008).

Muitos fatores podem influenciar a boa atividade desse espermatozóide como a osmolaridade, composição iônica, pH e temperatura (VETTORAZZI, 2012). As propriedades físicas do sêmen/esperma (volume, motilidade, vigor e concentração) assim como as características morfológicas são cruciais para a descrição da qualidade (ROUTRAY et al., 2007), pois não está limitada apenas na capacidade de fertilizar o ovócito, mas também na contribuição para um desenvolvimento e perpetuação da espécie.

A motilidade espermática de peixes ovíparos de água doce é desencadeamento por uma cascata de eventos que começa quando o espermatozóide entra em contato com a água podendo permanecer ativa por alguns minutos dependendo da espécie e dos fatores que estão intimamente ligados a essa ativação seminal (Figura 2).

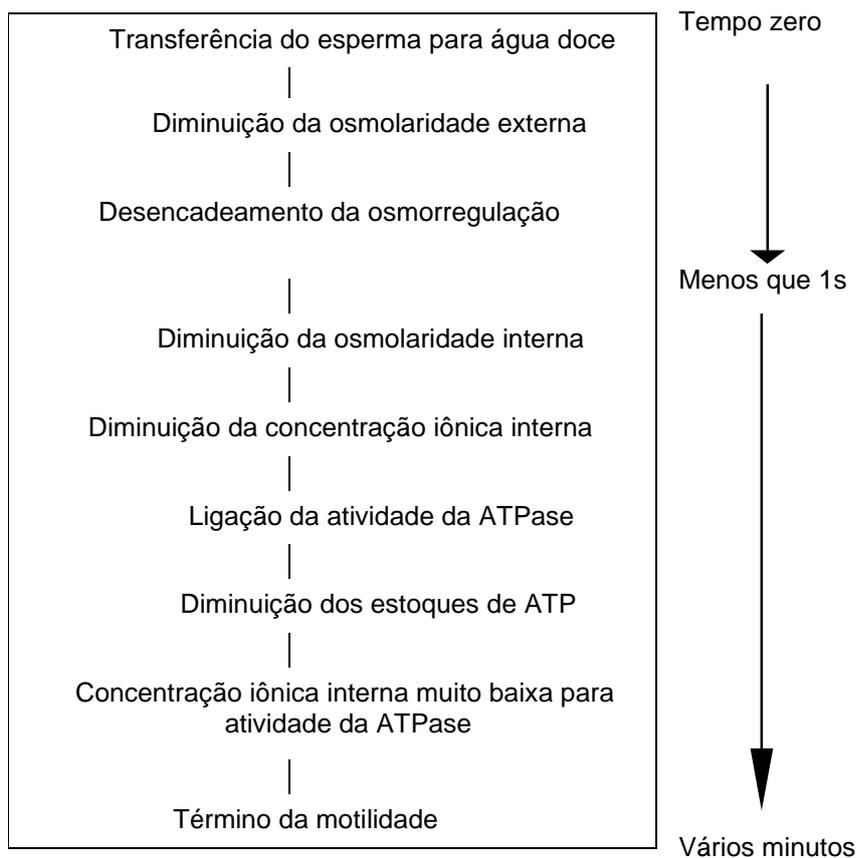


FIGURA 2 - Modificado de Cosson (2004). Cascata dos eventos desencadeadores da motilidade espermática.

2.4 Criopreservação espermática de Peixe

O sucesso da fertilização dependerá da qualidade dos gametas, pois do ponto de vista biológico, a qualidade do espermatozoide pode ser definida como a competência dos espermatozoides de explorar sua capacidade de nado para alcançar e fertilizar o óvulo (FAUVEL *et al.*, 2010). Atualmente existe uma busca intensa pela melhor forma de armazenar o espermatozoide, para sua utilização a longo prazo, sem comprometer a funcionalidade.

Assim sendo a técnica de criopreservação espermática de peixes vem com a intenção manter a funcionalidade estrutural das organelas mesmo depois de longos períodos criopreservadas. Permitindo desta forma a preservação do material genético por longo prazo e sua futura utilização em biotécnicas de reprodução assistida (SILVA *et al.*, 2018). Essa técnica consiste no armazenamento a longo prazo que aplica temperaturas extremamente baixas para manter espermatozoides viáveis, o mais comum é nitrogênio líquido a -196°C , com essa temperatura toda a atividade biológica

é interrompida, permitindo armazenar os espermatozóides por longos períodos (GALLEGO et al., 2019).

Segundo Tsa & Lin (2012) mais de 200 espécies de peixes de água doce e marinha já tinham protocolos de congelamento estabelecidos, facilitando desta forma a criação de estratégias de recuperação da ictiofauna por meio do criobanco de recursos genéticos de espécies ameaçadas de extinção (ASTURIANO et al., 2016). Outro importante progresso com o uso dessa técnica são os avanços da aquicultura como: manejo de ninhadas, programas de melhoramento genético, problemas reprodutivos específicos da espécie (GALLEGO et al., 2019).

Entretanto, durante o processo de criopreservação, as células espermáticas sofrem com as mudanças osmóticas, com o choque térmico e/ou estresse oxidativo, que contribuem para a redução da sua viabilidade e capacidade fecundante (CHEUQUEMÁN et al., 2018), o que leva o meio científico a intensa procura sobre o melhor protocolo para criopreservação.

2.5 Crioprotetores

A criopreservação tem algumas etapas que vão desde o resfriamento, congelamento, descongelamento, processos biofísicos e químicos, alterações osmóticas, desidratação, reidratação, alterações no volume celular, formação de cristais de gelo e principalmente a toxicidade que cada crioprotetores pode apresentar (CABRITA et al., 2014). Por esta razão a maior preocupação nas técnicas de criopreservação é encontrar um crioprotetor que durante o processo de congelamento e descongelamento atribua as células condições necessárias para que as mesmas não apresentem danos na sua funcionalidade.

Para o sucesso desta biotecnologia além da escolha de um bom agente crioprotetor também é necessário uma solução diluente, que deve ser determinada para cada espécie de forma diferente. O objetivo de manter a viabilidade espermática durante a redução da temperatura é adicionado ao esperma soluções diluentes tais como sais ou carboidratos (VIVEIROS et al., 2016). Esta solução deve ser isotônica para que não ocorra a ativação espermática durante este período.

A solução diluidora deverá favorecer a manutenção da célula espermática durante a curva de resfriamento antes e após a criopreservação fornecendo suporte metabólico, controle de pH e da osmolaridade do meio (GARCIA et al., 2016). Muitos

dos diluidores utilizados na criopreservação de esperma de mamíferos têm sido empregados com êxito em espécies de peixes, em especial o *Beltsville Thawing Solution* (BTS, Minitüb®) que é acrescido ao esperma suíno durante seu resfriamento e congelamento (MURGAS et al., 2001). Alguns pesquisadores já utilizaram este mesmo meio diluente associado a diferentes crioprotetores e obtiveram resultados expressivos em esperma (VIVEIROS et al., 2012; VARELA JUNIOR et al., 2015; MILIORINI et al., 2004).

Os crioprotetores funcionam para proteger a célula contra a formação de cristais intracelulares de gelo e desidratação, o que resulta em danos irreversíveis às células que afetam a membrana plasmática, mitocôndrias e estrutura da cromatina (SIEME et al., 2016). Esses crioprotetores podem ser classificados em dois grupos: permeável (glicerol, DMSO ou metanol) e não permeável (proteínas da gema, proteínas do sangue e açúcares). Nos últimos anos tem sido crescente a procura por agentes crioprotetores que controlem os fatores biofísicos para que a célula alcance uma sobrevivência a temperaturas criogênicas profundas, entre os principais agentes estão: álcoois e derivados, açúcares e álcoois de açúcar, polímeros, sulfóxidos e amidas e aminas (Tabela 2).

Tabela 1 Principais agentes crioprotetores.

Álcoois e Derivados	Açúcares e álcoois	Polímeros	Sulfóxidos e amidas	Aminas
Metanol	Glicose	Polietilenoglicol (PEG)	Dimetilsulfóxido	Proline
Etanol	Galactose	Polivinilpirrolidona (PVP)	Acetamida	Glutamina
Glicerol	Lactose	Dextrans	Formamida	Betaína
Propilenoglicol	Sacarose	Ficoll	Dimetil acetamida	
Etilenoglicol	Trehalose	Amido hidroxitilito		
	Rafinose	Proteínas séricas		
	Manitol	Proteínas do leite		
	Sorbitol	Peptonas		

Fonte: ELLIOTT et al., 2017.

O grupo de crioprotetores permeável está entre os mais relevantes para o sucesso da criopreservação, pois permeiam a membrana plasmática do esperma e aumentam a concentração intracelular (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017), fazendo com que a água deixe as células através do gradiente osmótico, evitando a formação

de cristais de gelo intracelulares, que causam danos para a célula (ELLIOTT et al., 2017 ; ASTURIANO et al., 2017).

Os crioprotetores não permeáveis protegem a membrana celular durante o congelamento e descongelamento, reduzindo o volume de água passível de ser congelada no interior da célula (SILVA et al., 2015; AISEN et al., 2002). Crioprotetores não permeáveis, como os açúcares e os aminoácidos, são capazes de estabelecer interações com bicamadas lipídicas da membrana, resguardando as células durante o processo de congelamento e melhorando os efeitos pós-descongelamento (CABRITA et al., 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2013).

Embora existam inúmeras pesquisas analisando vários tipos de agentes crioprotetores, ainda existem algumas espécies que necessitam de melhores resultados no pós-congelamento, bem como avaliações das estruturas da célula, não apenas da motilidade, embora seja uma análise muito importante para determinar a funcionalidade espermática.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

EFFECT OF AMIDE ON SEMEN CRYOPRESERVATION OF CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)

Efeitos da amida na criopreservação do sêmem de curimba (Prochilodus lineatus)

Izani Bonel Acosta, Carine Dahl. Corcini, Stela Mari Meneghello Gheller, Camila Ribeiro Carvalho Brito, Thiago de Lucas Silva Goulart, Antonio Sergio Varela Junior.

Publicado na revista CryoLetters, Volume 41, N^o1, janeiro de 2020.

EFFECT OF AMIDE ON SEMEN CRYOPRESERVATION OF CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)

I. B. ACOSTA^{1,2}, S. M. M. GHELLER^{1,2}, C. R. C BRITO^{1,2}, T.L.S. GOULART^{3,4}, C. D. CORCINI^{1*}, and A. S. VARELA JUNIOR^{1,4,5}

¹Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

²Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

³Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológica, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

⁵Programa de pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

*Corresponding author address: Carine Dahl Corcini, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. E-mail: corcinicd@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of different concentrations (2.5, 8 and 11%) of dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMA) on in vitro and in vivo sperm quality parameters of the fish Curimba (*Prochilodus lineatus*), when submitted to cryopreservation. The semen samples were diluted in the test medium with the cryoprotectants DMF, DMA and a control with Dimethyl sulfoxide (DMSO). After thawing, analyzes of time and rate of motility, membrane and DNA integrity, mitochondrial functionality, sperm viability and fertility were performed. Membrane integrity, DNA, fertility and mitochondrial functionality showed significant differences in the concentration of 2% DMF ($P < 0.05$), whereas for DMA the best concentration was 5% for the DNA assay. Our results showed that DMA and DMF amides in the concentrations 2, 5 and 8% are efficient as cryoprotectants for seminal cryopreservation for the species *Prochilodus lineatus*.

Key words: Curimba, fish, reproduction, spermatozoon, cryoprotectant.

INTRODUCTION

National aquaculture production has been growing in recent years (12). Among the species of interest we can mention Curimba (*Prochilodus lineatus*), due to its wide distribution in South America, being affected by the intense exploitation and degradation of ecosystems (1). We can also consider that the great interest and intensification of studies with this species occurs due to its high prolificacy, rapid growth and high rusticity (26).

Cryopreservation biotechnologies are a useful tool in animal reproduction, optimizing larvae production, and indicated to minimize the asynchrony of gamete maturation, selective breeding use and gamete transport (31). It can also help in the conservation of genetic variability, as well as in the replacement of natural stocks through the formation of germplasm banks (8).

Previous studies have reported damage to fish sperm due to cryopreservation, affecting motility, cell metabolism, plasma membrane structure, mitochondria, tail and chromatin (8, 21, 15). The use of cryoprotectants helps to maintain post - thawing sperm viability and for freshwater species, dimethylsulfoxide (DMSO) is the most used cryoprotectant, being most used the concentrations of 5-15% (30).

Another internal cryoprotective agent that is being used are the amides, its cryoprotectant action is attributed to low molecular weight and high cellular permeability, reducing the possibility of cell membrane damage (4). Its amine functional group associates with the hydrogen of the water molecule promoting a more efficient binding, when compared to other internal cryoprotectants, promoting the formation of intracellular gel that minimize lesions in the sperm membrane (7).

In Brazilian native species, the direct effect of amide use on cell structures was evaluated only for tambaqui (*Colossoma macropomum*) spermatozoa (29). In other species of fish such as *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus scrofa*, *Silurus glanis*, *Brycon orbignyanus*, *Paralichthys orbignyanus* and *Morone saxatilis* effects of amides was evaluated only on plasma membrane or mitochondria (15; 17).

Thus, the present study evaluated the effect of different concentrations (2, 5, 8 and 11%) of dimethylformamide (DMF) and dimethylacetamide (DMA) in vitro and in vivo on *P. lineatus* spermatozoa submitted to the cryopreservation process.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1

Animals and semen collection

Breeders of *P. lineatus* (n = 5) were obtained from a commercial fish farm located in the municipality of Pimenta Bueno, Rondônia, Brazil (11 ° 41'46.95 "S and 61 ° 13'47.50" W) during the breeding season (November to December). The semen was collected through abdominal massage (13), posterior application of carp pituitary extract (1mg / kg) intramuscularly, diluted in 0.5ml of sterile saline solution (0.9% NaCl).

For visual evaluation of sperm motility, NaHCO₃ 119mM was used as activating agent (9), at the rate of 1:4 (semen: activating factor), placed on a slide, covered with a coverslip, on phase contrast microscopy (Olympus BX 41® 400x) with 200x magnification (29). Only samples that had motility above 80% / 10s post activation were cryopreserved. Those contaminated with urine, feces and/or exhibiting motility prior to activation were discarded.

Diluents and Seminal Cryopreservation

All reagents used were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Except for the BTS (Beltsville Thawing Solution®).

Samples were diluted at the ratio of 1: 9 (semen: diluent) in BTS diluent basic solution (22) at pH 7.2 and 318mOsm / kg, containing cryoprotectant concentrations: DMSO (CH₃)₂SO, 10% (control) , dimethylformamide (C₃H₇NO) and dimethylacetamine (C₄H₉NO) at concentrations 2.5,8 and 11%, potted in 250µL straw (29). After two minutes of stabilization, the samples were frozen for 12 hours in a dry shipper cylinder (Taylor-Wharton, CP 300 *dry shipper model*), as described by Taitson and cols (25), and then transferred and stored in liquid nitrogen (-196 ° C).

Post - thaw spermatic quality - analyzes in vitro

The straws were thawed at 45 ° C / 5s (24). The contents of each sample were resuspended in eppendorf containing 400µL BTS at 22 ° C to minimize the toxicity of the cryoprotectant after thawing.

Sperm Motility / Motility Time

It was evaluated by optical microscopy visualization with phase contrast (Olympus CHK2-F-GS, América INC, São Paulo, SP) dilution ratio 1: 4 (semen: activating agent - NaHCO 3 119mM) according to Carolsfield and cols. (9). When

initiated the motility, a timer was triggered, and the duration of motility was considered from activation until only 10% of the cells had seminal motility.

Membrane integrity

According to the protocol described by Harrison and Vickers (14), a 10 μ L aliquot of semen was exposed to the combination of fluorescent probes, diluted in 40 μ L of isotonic saline, containing: 1.7 mM formaldehyde, 20 μ M carboxyfluorescein diacetate (CFDA - C4916-25mg) and 7.3 μ M of propidium iodide (IP-P4170-1g), incubated for 5min in a dark room. Cells showing green fluorescence were considered healthy and cells exhibiting a red or red and green fluorescence were considered damaged.

Mitochondrial Functionality

A 10 μ L aliquot of semen was added in a solution containing Rodhamina 123 (Rh123) (R8004-5mg) with Propidium Iodide (P4170-1g) and incubated at 37°C / 5min in a dark room (15). Cells that had the intermediate part with intense green fluorescence were considered to have uninjured mitochondria (functionally active). While cells without or with little green fluorescence intensity in the intermediate piece were considered non-functional.

DNA integrity

It was evaluated after placing a sample of 45 μ L of semen in 50 μ L of TNE (0.01M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.2). After 30 seconds, 200 μ L of 1X Triton solution was added and, after 30 seconds, 50 μ L of acridine orange (2mg / mL in deionized water). After five minutes, counted 200 spermatozoa; those with green fluorescence being considered with intact DNA, whereas those with red or orange fluorescence considered with damaged DNA (5).

Membrane integrity, DNA, and mitochondrial functionality evaluations were performed using an epifluorescence microscope (Olympus® BX 51, América INC, São Paulo, Brazil), using a WU filter with 450-490 nm excitation, 516-617nm emission and a 400x magnification.

Experiment 2

Egg collection

For this experiment, five females of *P. lineatus* were used, being kept in tanks with 0.7m water column, at 25°C. The females were induced to spawn by

administration of 5mg / kg diluted carp pituitary extract in 2 ml of saline solution (0.9% NaCl). After 9h, the eggs were extruded through abdominal massage and collected in a 1-liter becker and divided into aliquots of 2 g / female, for each treatment to be tested (29).

Fertilization

A straw were thawed for each treatment of each male in water - bath at 45 °C/5s. During fertilization, the eggs and sperm came in contact in a 50 mL becker, which was gently homogenized for 5s. The spermatic concentration per group was 7×10^4 . Spermatozoa were activated by the addition of 2mL of tank water at 29°C. Then, the contents were homogenized again for 5s and allowed to stand for 2min, afterwards adding 20mL of tank water at 29°C for hydration of the fertilized eggs. Subsequently, the contents were incubated in ascending and constant water flow (150mL / min) in 2L conical incubators. The stages of development were monitored with stereomicroscope loupes (Olympus SZX 7). Fertilization rate was made considering the number of eggs fertilized on the total of eggs (2g) and at the end expressed in percentage.

Statistical analysis

Descriptive data (means, standard deviation of the means) of each of the dependent variables of the treatments were generated. The Shapiro-Wilk normality test indicated that the data were not normalized, requiring the transformation of the data using the arcsin function. The means were analyzed using ANOVA followed by an LSD Test.

RESULTS

Regarding the semen collected, the volume was 4.0 ± 0.3 mL, sperm concentration was $8.3 \pm 0.2 \times 10^9$ / mL, sperm motility was $95.7 \pm 2.0\%$ and the motility period was $120, 6 \pm 5.0$ seconds.

The treatments tested in the DMA group (5%) presented the best results for DNA integrity (93.4 ± 5.1), compared to the 10% DMSO control group (52.4 ± 26.5), shown in Table 1.

The DMF group (2%) presented the best results in the *in vitro* analyzes for membrane integrity (82.6 ± 5.3), DNA (90.6 ± 3.5), and mitochondria ($87.0 \pm 0, 0$), in relation to the 10% DMSO control group ($31.2 \pm 20, 52.4 \pm 26.5, 37.6 \pm 39.9$,

respectively). For the fertilization rate, the best results were demonstrated in DMF treatments 2, 5 and 8% (31.8 ± 4.8 , 28.8 ± 10.3 and 12.0 ± 8.3).

For motility parameters and motility time, treatments with DMF (5 and 8%) presented the best results in relation to the control adopted (Table 2).

Table 1. Effect of different concentrations of dimethylformamide (DMF), dimethylacetamine (DMA) at concentrations of 2, 5, 8, 11% and dimethylsulfoxide (DMSO) at 10% concentration in *P. lineatus* semen samples, cryopreserved, with respect to the parameters DNA integrity, Mitochondrial Integrity (MI) and membrane integrity (Memb Int). Results in percentage (mean \pm standard deviation of the mean), (n = 5).

Crioprotectants	%	DNA (%)	MI (%)	Memb Int (%)
DMSO	10	$52,4 \pm 26,5^B$	$37,6 \pm 39,9^B$	$31,2 \pm 20,0^{BC}$
DMA	2	$65,2 \pm 11,1^{AB}$	$53,0 \pm 24,6^{AB}$	$26,8 \pm 11,6^{BC}$
	5	$93,4 \pm 5,1^A$	$83,2 \pm 2,0^{AB}$	$55,2 \pm 14,1^{AB}$
	8	$66,8 \pm 15,5^{AB}$	$68,6 \pm 18,0^{AB}$	$26,8 \pm 29,8^{BC}$
	11	$76,4 \pm 4,0^{AB}$	$66,8 \pm 27,2^{AB}$	$41,2 \pm 27,9^{BC}$
DMF	2	$90,6 \pm 3,5^A$	$87,0 \pm 0,0^A$	$82,6 \pm 5,3^A$
	5	$81,8 \pm 10,2^{AB}$	$78,0 \pm 4,8^{AB}$	$44,2 \pm 20,2^{BC}$
	8	$64,4 \pm 15,9^{AB}$	$67,4 \pm 32,0^{AB}$	$19,4 \pm 11,9^{BC}$
	11	$52,4 \pm 25,0^B$	$47,6 \pm 16,0^{AB}$	$9,2 \pm 3,7^C$

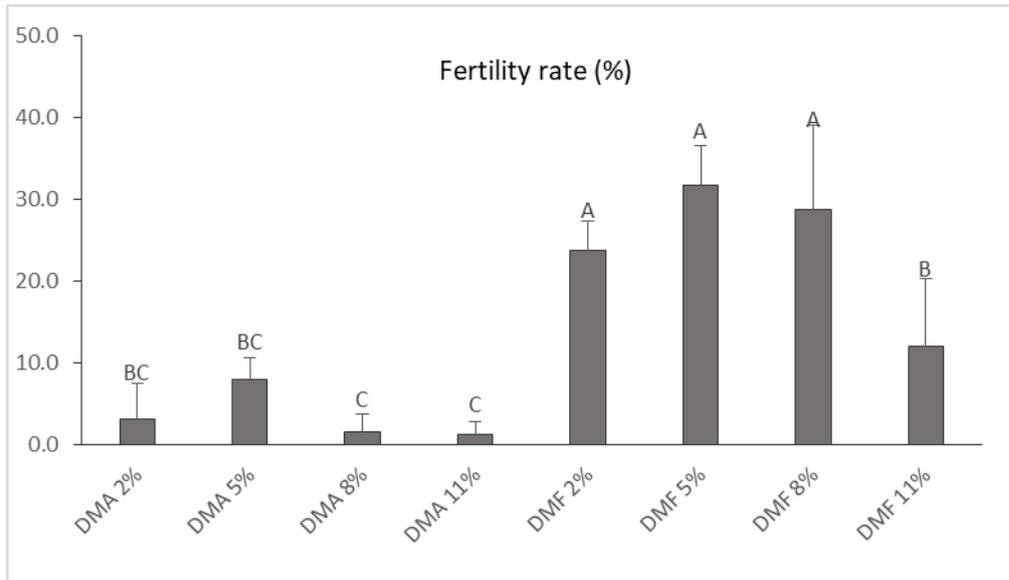
^{ABC}Different letters show statistical difference in the columns (P<0.05).

Table 2. Effect of different concentrations of dimethylformamide (DMF), dimethylacetamine (DMA) at concentrations of 2, 5, 8, 11% and dimethylsulfoxide DMSO at 10% concentration in cryopreserved semen samples from *P. lineatus* over the parameters of motility rate and motility time. Results expressed in percentage (mean \pm standard deviation of the mean). (n=5).

Crioprotectants	(%)	Motility rate (%)	Motility time (s)
DMSO	10	$18,0 \pm 16,4^{BC}$	$16,8 \pm 15,3^{AB}$
DMA	2	$16,0 \pm 8,9^{BC}$	$21,6 \pm 13,0^{AB}$
	5	$14,0 \pm 8,2^{BC}$	$14,6 \pm 9,6^{AB}$
	8	$8,0 \pm 10,9^C$	$7,6 \pm 10,4^B$
	11	$4,0 \pm 5,4^C$	$3,2 \pm 4,3^B$
DMF	2	$26,0 \pm 8,9^B$	$21,4 \pm 7,5^{AB}$
	5	$64,0 \pm 8,9^A$	$28,6 \pm 3,7^A$
	8	$62,0 \pm 30^A$	$29,6 \pm 5,3^A$
	11	$42,0 \pm 26,8^{AB}$	$15,2 \pm 8,6^{AB}$

^{ABC}Different letters show statistical difference in the columns (P<0.05).

Figure 1. Effect of different concentrations of dimethylformamide (DMF) and dimethylacetamine (DMA), at concentrations 2, 5, 8, 11%, over the fertility rate of cryopreserved Currimba (*P. lineatus*) semen samples.



^{ABC}Different letters show statistical difference in the columns ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The development of techniques that lead to the increase of animal production in the Curimba species, whether for animal production, maintenance of genetic variability and / or the formation of germplasm banks, is in line with economic and ecological issues currently raised, since both has the objective of increasing the number of fingerlings of the species (11). The results described in our study corroborate other studies on fish using amides as cryoprotectants (29, 16, 23). This cryoprotective effect of amides can be attributed to their lipophilic activity, low molecular weight and viscosity, which gives them high cellular permeability and efficient binding to water molecules, which can reduce osmotic stress and intracellular ice formation.

Sperm cryopreservation is considered a tool to increase reproductive management and consequently increase the number of juveniles produced from artificial fertilization (10). Fertilization was carried out in treatments containing dimethylacetamide and dimethylformamide. In all treatments, fertility rates were observed, however, we highlight the fertility rates found in DMF treatment 2, 5 and 8%, which can be attributed to a set of other analyzes such as integrity membrane, DNA, and mitochondrial functionality, especially in the 2% DMF group.

In this study, we investigated the quality of DNA integrity in the groups with higher fertilization rates, since the increase in DNA fragmentation in cryopreservation may increase the probability of fertilization by a spermatozoon with damaged DNA,

with negative impacts on hatching rates, due to compromised embryonic development (20). Thus, the integrity of paternal DNA must be preserved intact in cryopreservation, since levels of high fragmentation, when not repaired by the DNA of the fertilized oocyte, will impair the formation of viable embryos (3).

The sperm cells of fish are only activated in the external environment, due to the difference of osmolarity between seminal plasma and water, so membrane integrity plays a fundamental role in this process, acting as a barrier and when injured, they lose the ion exchange capacity between the intra- and extracellular medium in addition to changes in selective permeability, and may not respond to physical and chemical stimuli of the environment (28). Mitochondria are related to the amount of ATP available, which is necessary for the maintenance of motility and time of sperm motility, but even those that are superior to the control did not show statistical difference for motility and sperm motility time in DMF 2%. However this did not affect the fertilization rate, once the micropyle of the oocyte remains open for a maximum of 60 seconds after activation, and after this time it closes and the sperm cells can not penetrate this oocyte, thus the time that these cells remained in motion was enough to produce fertilization.

In other species the amides have already been tested, replacing other commonly used internal cryoprotectants. The use of DMF and DMA improved the quality of cryopreserved spermatozoa, being shown to be beneficial in substitution for DMSO or glycerol. The use of DMF and DMA improved the quality of cryopreserved sperm from swine (7), roosters (27), equine (2), dogs (18), sheeps (19) and goats (3). These studies demonstrate variations in the concentrations and types of amides used as to the benefit or not on the analyzed parameters. This can occur due to the lipid composition of the membranes lining the sperm cells in these species, making them more or less susceptible to the toxicity of the concentration and type of cryoprotectant used, requiring in vitro and in vivo sperm quality studies to determine the ideal concentration and amide class for each cryopreservation protocol to be used.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this study, we recommend the use of amide dimethylformamide in concentrations of 2, 5 and 8% for protocols of spermatic cryopreservation of *Prochilodus lineatus* sperm cells.

REFERENCES

1. Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC. (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Braz. J. Biol.*, 68, 1119-32.
2. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. (2005) Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science* - 89, 105–113.
3. Álvarez J.G. (2007) Aplicações clínicas Del estudio de fragmentación Del ADN espermático. *Revista Int Andrology*, 5, 354-63.
4. Ball BA & VO A. (2001) Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl*, 22, 1061–9.
5. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. (2010) Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science*, 119, 305-313.
6. Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra ACSD, Silva AR. (2011) Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63, p. 263–266.
7. Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim R, Corcini CD, Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia TJ, Deschamps JC, Corrêa MN. (2008) Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 69, 632– 8.
8. Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez Mp. (2001) Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol*, 26: 623–635.
9. Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni Filho E, Harvey BJ. (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*, 63, 472-489.
10. Chereguini O, García B, Herrera M, Martinez C, Hera, M. (2003) Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquac. Res.*, 34, 739–747.
11. Dias GCM, Cassel M, Oliveira LWj, Batlouni SR, Borella MI. (2017) Spermatogonia, Germline Cells, and Testicular Organization in the Characiform

Prochilodus lineatus Studied Using Histological, Stereological, and Morphometric Approaches. *Anat. Rec.*, 300, 589-599.

12. FAO – Food And Agriculture Organization (2016) The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Rome: FAO, 243 p.

13. Godinho HP, Amorim VMC, Peixoto MTD. (2003) Criopreservação do Esperma de Tilápia-Nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, Soluções Ativadoras e Refrigerador Criogênico. *Revista Brasileira Zootecnia*, 32, 1537-543.

14. Harrison RAP & Vickers SE. (1990). Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*, 88, 343-352.

15. He S & Woods LC. (2004) Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 48, 254-262.

16. Horvath A & Urbanyi B. (2000) The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research*, 31, 317-324.

17. Lanes CFC, Okamoto M, Cavalcante PV, Collares T, Campos VF, Deschamps JC, Robaldo RB, Marins LF, Sampaio LA. (2008) Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, 275, 361-36.

18. Mota Filho AC, Teles CH, Jucá RP, Cardoso JF, Uchoa DC, Campello CC, Silva AR, Silva LD. (2011) Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology*, 76, 1367-72.

19. Moustacas VS, Cruz BC, Varago FC, Miranda DA, Lage PG, Henry M. (2011) Extenders containing dimethylformamide associated or not with glycerol are ineffective for ovine sperm cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 924–925.

20. Ogier BB, Labbe C, Maise G. (1999) Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*, 39, 177–184.

21. Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez MP. (2010) Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction*, 139, 989–97.

22. Pursel VG & Johnson LA. (1975) Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science*, 40, 99-102.

23. Richardson GF, Miller TI, Mcniven MA. (2000) Cryopreservation of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult Research*, 31, 307-315.
24. Streit Jr DP, Benites C, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Caldieri Rf. (2006) sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, 7, 289-297.
25. Taitson PF, Cham E, Godinho HP. (2008) Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim. Reprod. Sci.*, 105, 283–291.
26. Taylor BW, Flecker AS, Hall Jr RO. (2006). Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. *Science*, 313, 833–6.
27. Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. (1999) Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78, 586–90.
28. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 9, 112–124.
29. Varela Junior AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, T. Lucia Jr T, Streit DP, Figueiredo MRC. (2012) Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, 78, 244–251.
30. Viveiros ATM & Godinho HP. (2009) Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review, *Fish. Physiol. Biochem.*, 35, 137–150.
31. Viveiros ATM, Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Caneppele D. (2012) Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, 78, 361–368.

3.2 Artigo 2

Açúcares na criopreservação espermática de curimba, *Prochilodus lineatus*.

Sugars in cryopreservation sperm Curimba, *Prochilodus lineatus*.

Izani Bonel Acosta¹, Carine Dahl. Corcini¹, Stela Mari Meneghello Gheller¹, Thiago de Lucas Silva Goulart², and Antonio Sergio Varela Junior^{1,2}

¹Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – izanibonel@hotmail.com, stelagheller@hotmail.com, corcinicd@gmail.com

²Universidade Federal de Rio Grande – Rio Grande/ RS – varelajras@gmail.com, tlgoulart16@hotmail.com

Será submetido à revista Aquaculture

Açúcares na criopreservação espermática de curimba, *Prochilodus lineatus*.

Sugars in the sperm cryopreservation of the Curimba, *Prochilodus lineatus*.

Izani Bonel Acosta¹, Carine Dahl. Corcini¹, Stela Mari Meneghello Gheller¹, Thiago de Lucas Silva Goulart², and Antonio Sergio Varela Junior^{1,2}

¹Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – izanibonel@hotmail.com,
stelagheller@hotmail.com, corcinicd@gmail.com

²Universidade Federal de Rio Grande – Rio Grande/ RS – varelajras@gmail.com,
tlgoulart16@hotmail.com

Abstract

The objective of this work was to develop a protocol for cryopreservation of Curimba fish (*Prochilodus lineatus*) semen using trehalose, sucrose, lactose and raffinose sugars. As synergy between cryoprotectants is not always beneficial, we aimed to test cryoprotectants separately at three concentrations (50, 100 and 150 mM) each and DMSO as a control. Post-thawing parameters of sperm kinetics (CASA) and cellular functionality were analyzed by flow cytometry. Regarding the analysis of sperm kinetics only the parameter ALH did not differ statistically from the control ($P > 0.05$), the other parameters presented lower rates than the control. In the analysis of the motility period at 100 mM trehalose concentration was superior ($P < 0.05$) to the control; being indicated its use. However, the results in the different parameters analyzed indicate that the other sugars tested did not have superior responses to the control (10% DMSO), indicating that the cryopreservation was not efficient.

Keywords: curimba; sugars; flow cytometry; kinetics, cryopreservation.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação de esperma do peixe Curimba (*Prochilodus lineatus*) com o uso dos açúcares trealose, sacarose, lactose e rafinose. Como a sinergia entre os crioprotetores nem sempre é benéfica tivemos como objetivo neste trabalho, testar os crioprotetores separadamente em três concentrações (50, 100 e 150 mM) cada um e o DMSO como controle. Pós-descongelamento foram analisados parâmetros de cinética espermática (CASA), e funcionalidade celular através da citometria de fluxo tempo. As análises de cinética espermática apenas o parâmetro ALH não diferiu estatisticamente do controle ($P > 0,05$), os demais parâmetros apresentaram taxas inferiores ao controle. Na análise do período de motilidade na concentração de 100 mM da trealose foi superior ($P < 0,05$) ao controle; sendo indicado sua utilização. Entretanto os resultados nos diferentes parâmetros analisados indicam que os demais açúcares testados não tiveram respostas superiores ao controle (10% DMSO), indicando não serem eficientes para utilização na criopreservação.

Palavras-chave: curimba, açúcares, citometria de fluxo, criopreservação

1. INTRODUÇÃO

A tentativa de criopreservar espermatozoides de peixes, bem como o desenvolvimento de diferentes protocolos que mantenham a integridade destas células tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, que desenvolvem metodologias cada vez mais eficazes em todo o mundo. Esses estudos se concentraram em espécies de climas temperados e com reprodução sazonal, devido ao seu alto valor comercial, seja como alimento, para fins de recreação, como a pesca ou para fins ambientais como o repovoamento (Martínez-Páramo et al., 2017).

A criopreservação apresenta algumas vantagens como a flexibilidade e operacionalização do período reprodutivo e uso para programas de reprodução assistida para peixes nativos (Cabrita et al., 2011), mantém a mostra viável por longos períodos para serem usadas (Magnotti et al., 2018). Essa biotecnologia pode ser considerada uma estratégia de recuperação da ictiofauna por meio da conservação do recurso genético de espécies ameaçadas de extinção (Asturiano et al., 2016).

Apesar do grande número de estudos sobre essas técnicas, ainda encontramos problemas durante esse processo, pois a viabilidade da célula durante a criopreservação do esperma de peixe pode ser influenciada por muitos fatores, incluindo diluentes, agentes crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxa de congelamento e temperaturas de descongelamento, resultando em danos ao DNA, mitocôndria, membrana e interferindo na cinética dos espermatozoides (Ahn et al., 2018; Pires et al., 2018).

Para diminuir os danos, são utilizados extensores (meios utilizados para diluir os espermatozoides) contendo crioprotetores (compostos usados para proteger os espermatozoides do congelamento e do choque térmico e da citotoxicidade). Entre os açúcares mais utilizados está a trealose e a sacarose que estabiliza as membranas ao interagir com os grupos polares da cabeça dos fosfolipídios (Fuller, 2004, Sarvi et al., 2006), bem como aumentam a osmolaridade do espaço extracelular que resulta na desidratação celular e diminuem a incidência de gelo intracelular (Ahmad et al., 2015).

O peixe de água doce Curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie migradora que apresenta ampla distribuição geográfica na América do Sul. Esta espécie está bem adaptada ao cativeiro, apresentando espermatozóide de alta qualidade durante toda a época de desova e uma boa resistência à manipulação durante os experimentos (Viveiros et al., 2015). O Curimba tem se destacado como modelo para pesquisa de reprodução em peixes (Paula et al., 2014), bem como pelo seu alto valor econômico e ecológico (Chagas et al., 2015).

Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos açúcares trealose, sacarose, lactose e rafinose nas células espermática da espécie curimba (*Prochilodus lineatus*) através de análises cinéticas e citometria de fluxo.

2. METODOLOGIA

Os espermatozoides dos peixes foram coletados, na propriedade de piscicultura Panamá localizada no município de Paulo Lopes – SC. Foram utilizados 15 animais para o trabalho, os quais foram induzidos hormonalmente com extrato de hipófise de carpa e após 12h, receberam massagem abdominal para extrusão do esperma. O conteúdo coletado foi armazenado em tubos falcon e mantido em isopor com temperatura de 8°C, onde posteriormente foi avaliado em microscópio de contraste de fases, em lamina sob lâmina. Foram congeladas apenas as amostras que obtiveram

80% ou mais de motilidade (subjetiva) após 10 segundos de ativação. Em seguida, foi adicionado ao esperma coletado o diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) de forma isotérmica, com pH 7,2 e osmolaridade 330 mOsm/Kg, na proporção 1:9 (v/v).

Esse conteúdo seminal de cada peixe (15 peixes) foi individualmente distribuído nos 13 tratamentos. Para realização dos experimentos, foram adicionados os açúcares trealose, sacarose, lactose e rafinose nas concentrações de 50, 100 e 150 mM (individualmente) e o crioprotetor penetrante Dimetilsulfóxido (DSMO) a 10% no esperma já com BTS. Esse material foi envasado em palhetas de 0,25 µl, devidamente identificadas, vedadas com álcool polivinílico e armazenadas em raques de metal, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 20 minutos, para maior contato entre o esperma e os tratamentos. Em seguida as raques foram colocadas em botijão Dryshipper com vapor de nitrogênio a -70° C por 12 horas, e transferidas para botijão de nitrogênio líquido a -196°C. O descongelamento das palhetas foi em banho-maria a 37°C por 8 segundos, após o conteúdo das mesmas foram colocados em eppendorf de 1,5 mL para realização das análises de cinética espermática e funcionalidade celular.

2.1. Cinética Espermática

As amostras de espermatozoides foram ativadas misturando 1 µL da amostra com 3 µL de água destilada. As análises da cinética espermática foram realizadas examinando o espermatozoide ativado, usando um microscópio com amostras sendo colocadas em uma lâmina e uma lamínula sendo aplicada (Carneiro et al., 2012). Um total de 10 campos foi avaliado dentro de 5 a 10 s do processo de ativação e um mínimo de 1000 células foi analisado. As variáveis avaliadas foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), VCL (velocidade curvilínea, µm / s), VSL (velocidade linear reta, µm / s), VAP (velocidade média do percurso, µm / s), LIN (Linearidade, [VSL / VCL] x100), distância média percorrida DAP (µm), distância curvilínea DCL (µm), distância retilínea DSL (µm), velocidade (VSL / VAP%), deslocamento lateral da cabeça ALH (µm) e velocidade retilínea VSL (µm), BCF batimento cruzado (Hz) (Dziewulska et al., 2011). O tempo de motilidade (T.M.) foi considerado como o tempo que começa na ativação espermática até o final do movimento progressivo (Varela et al., 2015).

2.2. Citometria de fluxo

O equipamento Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies) foi utilizado para análise citométrica de fluxo usando os lasers azul (argônio 488 nm) e violeta (UV 405 nm). Este último foi utilizado para a análise das seguintes estruturas celulares: fragmentação do DNA, fluidez da membrana, funcionalidade da membrana e mitocondrial, peroxidação lipídica (LPO), interrupção celular e concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os resultados foram obtidos no software versão 2.1 (Life Technologies). O corante Hoechst 33.342 a 16,2 mM foi utilizado para todas as análises citométricas de fluxo, exceto a fragmentação do DNA. Para eliminar eventos não espermáticos, foram gerados 33.342 gráficos de dispersão negativos FSCxSSC e Hoeschst (Alves et al., 2016). As células foram coradas com fluoróforos que foram adicionados ao PBS sem cálcio (0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 1,15 g de Na₂HPO₄ e 8 g de NaCl em 1 L de água desionizada, pH 7,2) e um total de 10.000 espermatozoides foram contados por análise (excluindo detritos).

2.2.1. Funcionalidade de membrana

A funcionalidade da membrana foi avaliada usando o iodeto de fluoróforos propídio (PI) e Sybr14 (Minitube, Tiefenbach, Alemanha). Uma alíquota de esperma descongelado foi incubada por 10 min em uma solução contendo 0,25 µM de Sybr14 e 7,5 µM IP (conforme instruções do fabricante - Minitube). Os espermatozoides foram classificados como não danificados com membrana funcional (Sybr + / IP-) ou danificados com / sem membrana não funcional (Sybr + / IP +, Sybr- / IP +, Sybr- / IP-) (Figuroa et al., 2016). Para verificar a porcentagem de ruptura celular, as células que foram IP - foram classificadas como não rompidas, enquanto as que foram IP + foram consideradas rompidas.

2.2.2. Fluidez da membrana

A fluidez da membrana foi verificada por incubação de 10 µL da amostra em 2,7 µM de corante merofianina hidrofóbica 540 (M540) e 0,1 µM de YO PRO – 1 (Invitrogen-Eugene, OR, EUA) por 10 min. Células de alto fluido (alta concentração de M540) e baixa fluidez (baixa concentração de M540) foram avaliadas apenas quanto à presença de espermatozoides intactos (YO-PRO negativo) (Fernández-Gago et al., 2013). O fluxo da membrana foi calculado usando a seguinte fórmula: [(número de

espermatozoides com alta fluidez) / (número de espermatozoides com alta fluidez) + (espermatozoides com baixa fluidez)] × 100.

2.2.3. Funcionalidade mitocondrial

Para avaliar a funcionalidade mitocondrial, foram incubados 10 µL da amostra descongelada com Rhodamine 123 3,1 µM (fluorescência verde) e IP 7,5 µM por 10 min. As células espermáticas foram classificadas como tendo alta funcionalidade (alta fluorescência por acumulação de rodamina) ou baixa funcionalidade (baixa fluorescência, baixa acumulação de rodamina) após serem analisadas quanto à presença de espermatozoides intactos (IP negativo) (Liu et al., 2015). A taxa de funcionalidade mitocondrial foi calculada pela seguinte fórmula: [(número de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial) / (alto potencial de contagem de espermatozoides da membrana mitocondrial + espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial)] × 100 (Alves et al., 2016).

2.2.4. Índice de fragmentação de DNA

A integridade do DNA foi avaliada pelo ensaio de estrutura da cromatina (SCSA). Para verificar esta variável, foram adicionados 10 µL de espermatozoides descongelados a 5 µL de TNE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDC 0,001 M, pH 7,2) e 10 µL de Triton 1X (Triton X-100, 1%) (V / V) em intervalos de 30s. Adicionou-se então corante acridina laranja ao acima. Isto foi seguido por um curto período de incubação entre 30s a 2 minutos após o qual os resultados foram analisados. Espermatozoides com DNA fragmentado apresentaram fluorescência vermelha, enquanto aqueles com DNA intacto exibiram fluorescência verde (Evenson e Jost, 2001). O índice da taxa de fragmentação do DNA (DFI%) foi calculado da seguinte forma: Intensidade de fluorescência vermelha / [intensidade total de fluorescência (vermelho + verde)] (Alves et al., 2016).

2.2.5. Concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A concentração de ERO foi determinada pela adição de 1,0 µM de diacetato de 2'7'diclorofluoresceína (H2DCFDA) (emite fluorescência verde quando oxidada) e IP de 7,5 µM a 10 µL de amostra descongelada, seguido de uma incubação por 10 min. A produção de ERO foi medida em termos de intensidade de fluorescência verde

média em células vivas com IP negativo, excluindo assim células com membranas rompidas (Domínguez-Rebolledo et al., 2011).

2.2.6. Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica dos espermatozóides foi avaliada imediatamente após o descongelamento. Bodipy C11 (Hagedorn et al., 2012) foi adicionado a 10 µL da amostra para uma concentração final de 1 µM e incubado por 2h a 20°C. Apenas espermatozóides vivos foram analisados. A taxa de peroxidação lipídica foi calculada da seguinte forma: [(intensidade mediana da fluorescência verde (lipídeo peroxidado) / (intensidade mediana da fluorescência verde + fluorescência mediana vermelha (lipídeo não peroxidado) ×100 (Alves et al., 2016).

2.3. Análise estatística

Todas as variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido da análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey. Os diferentes crioprotetores e suas concentrações foram considerados variáveis independentes, enquanto todas as outras variáveis, como motilidade total, motilidade progressiva, tempo móvel, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, ALH, BCF, funcionalidade da membrana, mitocondrial funcionalidade, fluidez da membrana, índice de fragmentação do DNA, ERO, LPO e ruptura celular foram consideradas variáveis dependentes. Todos os procedimentos analíticos foram realizados com o software Statistix 2010. O valor de $P < 0,05$ foi considerado para indicar diferenças significativas.

3. RESULTADOS

Na tabela 1 podemos verificar que a adição de açúcares, independente da concentração, a trealose foi mais eficaz que os demais na fluidez de membrana e período de motilidade, diferindo estatisticamente do controle nas concentrações de 150 e 100 mM. No índice de fragmentação de DNA a adição do açúcar rafinose apresentou valores inferiores nas três concentrações avaliadas quando comparadas com o controle, sendo a concentração de 50 mM a menor ($P < 0,05$). Já na análise de espécies reativas de oxigênio (ROS) observamos que a sacarose em

todas as concentrações causou menos estresse a célula que os demais açúcares (Tabela 1).

Nos parâmetros da Cinética (Tabela 2) verificamos que o controle apresentou os melhores índices, diferindo dos açúcares testados em quase todos os parâmetros. Apenas no parâmetro ALH (deslocamento lateral da cabeça) nos açúcares Trealose (150 mM) e Lactose (100 mM) foi superior ao controle (DMSO), mas não diferiu ($P > 0,05$). Outro parâmetro que não diferiu do controle nas diferentes concentrações foi o BCF (batimento cruzado) na presença do açúcar Lactose nas três concentrações.

Com relação a comparação dos tratamentos entre si, observamos que para os parâmetros de Funcionalidade Celular e motilidade (Tabela 1) a concentração de 150 mM nos açúcares Trealose e Lactose foram predominantemente mais benéfica para célula que as demais concentrações, enquanto que para Sacarose e Rafinose a concentração de 100 mM foi a mais adequada. Nos parâmetros da Cinética espermática verificamos que a concentração de 50 mM dos açúcares Sacarose, Rafinose e Lactose tiveram os melhores índices na maioria das análises realizadas.

4. DISCUSSÃO

A procura por protocolos cada vez mais aprimorados para preservação de esperma de peixes vem de encontro às questões econômicas e ecológicas atuais, pois a preocupação vai desde a ação antrópica que degrada o habitat desses animais até o uso dessas biotecnologias como ferramenta de interesse econômico e comercial. A criopreservação vem ao encontro desses interesses comerciais, econômicos e científicos na tentativa de encontrar uma técnica que permita manter o esperma por longos períodos criopreservado e com alta funcionalidade em suas estruturas pós degelo.

Neste estudo verificamos que a trealose na concentração de 100 mM pode ser benéfica na adição ao diluente BTS com 10% de DMSO. Pires et al. (2018) em estudo com o peixe pacu (*Piaractus mesopotamicus*) também encontrou resultados semelhantes ao nosso, usando trealose associada com BTS com 10% de DMSO.

Com taxas menores que a trealose, a sacarose em nosso estudo teve o período de motilidade ($77,5 \pm 4,0$) mais alta do que no trabalho de Ahn et al. (2018) com garoupa com a associação de crioprotetores ($73,7 \pm 1,7$). Essa informação confirma que as respostas desse crioprotetor (sacarose) mesmo sendo inferiores as taxas de

trealose e DMSO encontradas em nosso trabalho foi boa quando comparadas com outros estudos.

A lactose e rafinose nos parâmetros de funcionalidade celular tiveram taxas significativamente menores do que o controle (DMSO), em algumas variáveis (integridade da membrana e período de motilidade). Segundo Felizardo et al. (2010) a combinação dos crioprotetores DMSO e lactose realizada no seu estudo foi benéfica para período de motilidade ($64 \pm 2,6$), esse valor do período de motilidade corrobora como nosso estudo na concentração de 150 mM ($63,0 \pm 2,8$), embora neste experimento esse resultado tenha sido inferior aos demais tratamentos. O fato dos resultados aqui apresentados serem superiores ao de Felizardo et al. (2010), pode ser devido a diferença na concentração do DMSO, pois essa variável pode interferir diretamente na passagem de água para o interior da célula.

No trabalho de Felizardo et al. (2010) com DMSO a 8% teve o período de motilidade (70 ± 51) inferior ao nosso, o qual tivemos uma motilidade de $80,3 \pm 4,9$ que também foi superior ao trabalho de Carvalho et al. (2017), o qual testou DMSO 10% ($73 \pm 19,23$). Entretanto no presente estudo DMSO 10% teve taxas menores que o crioprotetor trealose em todos os tratamentos (50, 100 e 150 mM) na análise de período de motilidade, mostrando que esse açúcar tem potencial para ser utilizado como crioprotetor na criopreservação seminal de curimba.

Nas avaliações sobre a cinética espermática a comparação dos crioprotetores com o controle, percebemos a concentração de 50 mM diferiu, mostrando-se inferior ao controle em de quase todas as concentrações nos diferentes crioprotetores. Entretanto Pires et al. (2018) apresentou diferença estatística entre os tratamentos (50, 100 e 150 mM) apenas nos parâmetros ALH e BCF, já em nosso estudo embora não tenham diferido os açúcares Trealose (150 mM) e Lactose (100 mM) apresentaram valores maiores que o controle, sendo estes parâmetros de extrema importância pois estão diretamente relacionados com a fertilização. Essa diferença segundo Fernandez et al. (2018) pode ser devido toxicidade dos diversos diluentes e crioprotetores ser diferente para cada espécie, pois a composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente, assim se faz necessário o desenvolvimento de protocolos de criopreservação diferenciado para cada espécie.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nestas condições experimentais sugerimos que utilize a concentração de 100 mM de trealose adicionado ao BTS com 10% de DMSO, para a criopreservação espermática de Curimba, *Prochilodus lineatus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, E., NASEER, Z., AKSOY, M., KÜÇÜK, N., UÇAN, U., SERIN, CEYLAN, A. Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine-induced acrosome reaction in ram spermatozoon. **Andrologia**, v.47, p.786-92, 2014.
- AHN, J.Y., PARK, J.Y., LIM, H.K. Effects of different diluents, cryoprotective agents, and freezing rates on sperm cryopreservation in *Epinephelus akaara*. **Cryobiology**, v.83, p.60–64, 2018.
- ALVES, J.P., CORCINI, C.D., SILVA, E.F.E., CALDAS, J.S., CARDOSO, T.F., PIEDRAS, S.R.N., JARDIM, R.D., VARELA JUNIOR, A.S. The role of amides in seminal cryopreservation of wild silverside, *Odontesthes bonariensis*. **Cryobiology**, p.73, v.83-387, 2016.
- ASTURIANO, J.F., CABRITA, E., HORVÁTH, A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v.1245, p.69–76, 2016.
- CABRITA, E., MA, S., DIOGO, P., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., SARASQUETE, C., DINIS, M.T. The influence of certain amino acids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.189–195, 2011.
- CARNEIRO, P.C.F., AZEVEDO, H.C., SANTOS, J.P., MARIA, A.N., Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm: extenders, cryoprotectants, dilution ratios freezing methods, **CryoLetters**, v.33, p.385-93, 2012.
- CARVALHO, A.F.S., MURGAS, L.D.S., M.R.F., ANDRADE, E.S., FELIZARDO, V.O., ALLAMAN, I.B., PAULA, F.G. Canonical correlation analysis to identify the semen characteristics used to forecast the freeze survival of curimba (*Prochilodus lineatus*) spermatozoa. **Cryoletters**, v.38, p.263-268, 2017.
- CHAGAS, A.T., CARMO, A.O., COSTA, M.A., RESENDE, L.C., BRANDÃO DIAS, P.F., MARTINS, A.P. Description and comparison of two economically important fish species mitogenomes: *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Mitochondrial DNA**, v.14, p.1–2, 2015.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E., MARTÍNEZ-PASTOR, F., BISBAL, A.F., ROS-SANTAELLA, J.L., GARCÍA-ALVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., SOLER, A.J., GARDE, J.J., FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance individual male variability. **Reprod Domest Anim**, v.46, p.393-03, 2011.

EVENSON, D., JOST, L. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. **Current Protocols in Cytometry**, v.7, p.13-23, 2001.

FELIZARDO, V., MELLO, R., MURGAS, L.D.S., ANDRADE, E., DRUMOND, M.M., ROSA, P. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal reproduction Science**, v.122, p.259-63, 2010.

FIGUEROA, E., VALDEBENITO, I., FARIAS, J.G. Review article: Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquacult. Res.**v.47, p.1691-1705, 2016.

FULLER, B.J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo-Letters**, v.25, p.375-388, 2004.

HAGEDORN, M., MCCARTHY, M., CARTER, V.L., MEYERS, S.A. (2012). Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PLoS One**, v.7, p.39397, 2012.

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

MAGNOTTI, C., CERQUEIRA, V., LEE-ESTEVEZ, M., FARIAS, J.G., VALDEBENITO, I., FIGUEROA, E. Cryopreservation and vitrification of fish semen: A review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, v.10, p.15–25, 2018.

MARIA, A.N., VIVEIROS, A.T.M., FREITAS, FERNÁNDEZ-GAGO, R., DOMÍNGUEZ, J.C., MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post–thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v.80, p.400-410, 2013.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., HORVÁTH, Á., LABBÉ, C., ZHANG, T., ROBLES, V., HERRÁEZ, P., SUQUET, M., ADAMS, S., VIVEIROS, A., TIERSCH, T., CABRITA, E. Cryobanking aquatic species. **Aquaculture**, v.472, p.156–77, 2017.

PAULA, D.A.J., MACHADO, M.R.F., MURGAS, L.D.S., RABELO, D., ZANGERÔNIMO, M.G., REIS NETO, R.V., ANDRADE, E.A. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v.12, p.835–844, 2014.

PIRES, D.M., CORCINI, C.D., SILVA, A.C., GHELLER, S.M.M., PEREIRA, F.A., PEREIRA, J.R., MUELBERT, J.R.E., GARCIA, J.R.E., VARELA, A.S. Association Between DmsO And Sugars In The Sperm Cryopreservation Of Pacu. **Cryoletters**, v.39, p.121-130, 2018.

SARVI, K., NIKSIRAT, H., MOJAZI AMIRI, B., MIRTORABI, S. M., RAFIEE, G. R., & BAKHTIYARI, M. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). **Aquaculture**, v.256, p.564–569, 2006.

VARELA JUNIOR, A.S., GOULARTE, K.L., ALVES, J.P., PEREIRA, F.A., SILVA, E.F., CARDOSO, T.F., JARDIM, R.D., STREIT, DP JR., CORCINI, C.D. Methods of

cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.157, p.71–77, 2015.

VIVEIROS, A.T.M., NASCIMENTO, A.F., LEAL, M.C., GONÇALVES A.C.S., ORFÃO, L.H., COSSON, J. (2015). 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 Physiol Biochem**, V.41, p.193-201, 2015.

Tabela 1 - Análise dos parâmetros da Funcionalidade Celular e motilidade das organelas sob influência dos açúcares trealose, rafinose, sacarose e lactose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM.

Análise		Tratamentos			
		150	100	50	Controle
FLU%	Trehalose	41,0 ± 2,5 ^A	38,1 ± 3,1 ^A	36,2 ± 3,1 ^A	34,4 ± 2,5
	Raffinose	33,7 ± 3,3 ^A	37,80 ± 3,4 ^A	30,6 ± 2,9 ^A	
	Sacarose	33,2 ± 2,2 ^A	38,1 ± 2,1 ^A	35,5 ± 2,37 ^A	
	Lactose	37,9 ± 3,2 ^A	35,2 ± 2,3 ^A	36,7 ± 2,5 ^A	
MEM%	Trehalose	62,5 ± 3,6 ^A	54,4 ± 3,9 ^B	49,0 ± 4,7 ^B	51,9 ± 4,1
	Raffinose	51,0 ± 4,3 ^A	57,8 ± 3,8 ^A	54,5 ± 3,8 ^A	
	Sacarose	57,5 ± 3,1 ^A	57,9 ± 3,3 ^A	56,4 ± 3,5 ^A	
	Lactose	59,8 ± 3,4 ^A	41,4 ± 3,4 ^{B*}	49,6 ± 3,6 ^B	
MIT%	Trehalose	31,5 ± 4,1 ^A	27,7 ± 3,3 ^A	28,0 ± 3,6 ^A	31,94 ± 4,6
	Raffinose	31,7 ± 4,2 ^A	38,4 ± 4,7 ^A	31,5 ± 3,3 ^A	
	Sacarose	35,3 ± 5,2 ^A	38,6 ± 4,8 ^A	33,9 ± 5,3 ^A	
	Lactose	33,5 ± 3,7 ^A	31,4 ± 4,0 ^A	39,0 ± 3,9 ^A	
LPO%	Trehalose	11,1 ± 1,7 ^A	14,7 ± 2,0 ^A	11,4 ± 1,8 ^A	15,1 ± 3,0
	Raffinose	14,2 ± 2,2 ^A	10,8 ± 1,7 ^A	12,2 ± 2,1 ^A	
	Sacarose	17,6 ± 3,1 ^A	10,9 ± 1,7 ^B	11,1 ± 1,6 ^B	
	Lactose	13,9 ± 2,0 ^A	11,4 ± 1,5 ^A	14,8 ± 2,6 ^A	
ROS	Trehalose	28772 ± 5623 ^B	67307 ± 17375 ^{AB}	86519 ± 22980 ^A	52929 ± 15987
	Raffinose	46934 ± 15488 ^A	60950 ± 17668 ^A	39941 ± 9092 ^A	
	Sacarose	34495 ± 11072 ^A	26806 ± 6277 ^A	42088 ± 11386 ^A	
	Lactose	24936 ± 5943 ^B	129075 ± 53513 ^A	75794 ± 19044 ^{AB}	
DFI	Trehalose	0,0605 ± 0,006 ^B	0,0701 ± 0,005 ^{AB}	0,0759 ± 0,002 ^A	0,0723 ± 0,004
	Raffinose	0,0646 ± 0,005 ^A	0,0639 ± 0,006 ^A	0,0544 ± 0,007 ^{A*}	
	Sacarose	0,0649 ± 0,005 ^A	0,0713 ± 0,005 ^A	0,0590 ± 0,006 ^A	
	Lactose	0,0674 ± 0,005 ^{AB}	0,0570 ± 0,006 ^{B*}	0,0759 ± 0,003 ^A	
P.M.%	Trehalose	85,2 ± 3,3 ^A	92,4 ± 3,9 ^{A*}	79,2 ± 7,7 ^B	80,3 ± 4,9
	Raffinose	72,2 ± 3,9 ^A	77,8 ± 2,2 ^A	79,8 ± 5,6 ^A	
	Sacarose	65,4 ± 2,5 ^B	76,0 ± 5,4 ^{AB}	77,5 ± 4,0 ^A	
	Lactose	63,0 ± 2,8 ^{A*}	70,6 ± 2,7 ^A	67,9 ± 6,8 ^A	
M.T.%	Trehalose	24,4 ± 0,9 ^A	23,1 ± 0,8 ^{AB}	21,9 ± 0,9 ^{AB}	23,0 ± 0,9
	Raffinose	21,6 ± 0,9 ^A	23,0 ± 1,1 ^A	22,9 ± 1,1 ^A	
	Sacarose	22,5 ± 0,8 ^A	20,9 ± 0,8 ^A	22,1 ± 0,8 ^A	
	Lactose	24,8 ± 1,1 ^A	22,6 ± 0,9 ^A	22,45 ± 0,7 ^A	
M.P.%	Trehalose	16,2 ± 0,8 ^A	15,7 ± 0,7 ^A	14,0 ± 0,8 ^A	15,9 ± 0,8
	Raffinose	13,7 ± 0,8 ^A	15,8 ± 1,0 ^A	15,7 ± 1,0 ^A	
	Sacarose	14,2 ± 0,8 ^A	13,2 ± 0,8 ^{A*}	14,3 ± 0,8 ^A	
	Lactose	15,7 ± 1,1 ^B	14,5 ± 0,8 ^A	15,4 ± 0,7 ^A	

Fluidez de membrana (FLU), funcionalidade de membrana (MEM), funcionalidade mitocondrial (MIT), peroxidação lipídica (LPO), período de motilidade (P.M.), Motilidade total (M.T.), motilidade progressiva (M.P.), espécies reativas de oxigênio (ROS) e integridade de DNA (DNA), lactose 50, 100 e 150 mM, rafinose 50, 100 e 150 mM. Letras diferentes na mesma linha diferença estatística ($P < 0.05$) entre as concentrações, * diferença estatística ($P < 0.05$) com relação ao controle.

Tabela 2 - Análise dos parâmetros da Cinética Espermática sob influência do açúcar lactose e rafinose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM.

Análise	Tratamentos				
	150	100	50	Controle	
DAP	Trehalose	14,7 ± 0,3 ^{AB*}	15,6 ± 0,3 ^A	13,7 ± 0,2 ^{B*}	16,4 ± 0,4
	Raffinose	13,6 ± 0,3 ^{B*}	13,8 ± 0,3 ^{B*}	15,2 ± 0,4 ^{A*}	
	Sacarose	13,7 ± 0,3 ^{B*}	14,4 ± 0,3 ^{AB*}	14,8 ± 0,4 ^{A*}	
	Lactose	13,6 ± 0,2 ^{B*}	15,1 ± 0,3 ^{A*}	15,7 ± 0,4 ^A	
DCL	Trehalose	18,4 ± 0,3 ^{B*}	19,6 ± 0,3 ^A	17,7 ± 0,3 ^{B*}	19,8 ± 0,4
	Raffinose	17,8 ± 0,3 ^{B*}	17,6 ± 0,4 ^{B*}	18,8 ± 0,4 ^A	
	Sacarose	18,5 ± 0,3 ^{A*}	18,4 ± 0,4 ^{A*}	18,5 ± 0,4 ^{A*}	
	Lactose	18,2 ± 0,3 ^{B*}	19,5 ± 0,3 ^A	19,4 ± 0,5 ^{AB}	
DSL	Trehalose	12,2 ± 0,3 ^{AB*}	12,9 ± 0,2 ^{A*}	11,5 ± 0,2 ^{B*}	13,9 ± 0,3
	Raffinose	11,2 ± 0,2 ^{B*}	11,5 ± 0,3 ^{B*}	12,7 ± 0,3 ^A	
	Sacarose	11,5 ± 0,3 ^{A*}	12,0 ± 0,3 ^{A*}	12,2 ± 0,3 ^{A*}	
	Lactose	11,4 ± 0,2 ^{B*}	12,5 ± 0,2 ^A	13,3 ± 0,4 ^A	
VAP	Trehalose	31,9 ± 0,7 ^{A*}	33,5 ± 0,7 ^A	29,5 ± 0,6 ^{B*}	35,4 ± 0,9
	Raffinose	29,1 ± 0,6 ^{B*}	29,5 ± 0,8 ^{B*}	32,5 ± 0,8 ^A	
	Sacarose	29,2 ± 0,7 ^{B*}	30,9 ± 0,7 ^{AB*}	31,7 ± 0,8 ^{A*}	
	Lactose	29,0 ± 0,6 ^{B*}	32,5 ± 0,6 ^{A*}	33,8 ± 1,0 ^A	
VCL	Trehalose	39,8 ± 0,8 ^{B*}	42,1 ± 0,8 ^A	37,9 ± 0,7 ^B	42,8 ± 1,0
	Raffinose	38,0 ± 0,8 ^{AB*}	37,6 ± 0,9 ^{B*}	40,3 ± 0,9 ^A	
	Sacarose	39,4 ± 0,8 ^A	39,4 ± 0,9 ^A	39,7 ± 0,9 ^A	
	Lactose	38,7 ± 0,7 ^{B*}	41,9 ± 0,8 ^A	41,7 ± 1,2 ^A	
VSL	Trehalose	26,5 ± 0,6 ^{A*}	27,7 ± 0,6 ^{A*}	24,8 ± 0,5 ^{B*}	30,1 ± 0,8
	Raffinose	23,9 ± 0,6 ^{B*}	24,7 ± 0,7 ^{B*}	27,3 ± 0,6 ^{A*}	
	Sacarose	24,5 ± 0,7 ^{A*}	25,8 ± 0,7 ^{A*}	26,2 ± 0,7 ^{A*}	
	Lactose	24,3 ± 0,5 ^{B*}	26,9 ± 0,6 ^{A*}	28,8 ± 0,9 ^A	
STR	Trehalose	0,825 ± 0,004 ^{A*}	0,824 ± 0,004 ^{A*}	0,835 ± 0,004 ^A	0,846 ± 0,003
	Raffinose	0,818 ± 0,005 ^{B*}	0,825 ± 0,004 ^{AB*}	0,837 ± 0,005 ^A	
	Sacarose	0,827 ± 0,004 ^{A*}	0,824 ± 0,005 ^{A*}	0,823 ± 0,003 ^{A*}	
	Lactose	0,826 ± 0,004 ^{AB*}	0,820 ± 0,004 ^{B*}	0,839 ± 0,003 ^A	
LIN	Trehalose	0,660 ± 0,007 ^A	0,654 ± 0,006 ^A	0,651 ± 0,007 ^A	0,698 ± 0,006
	Raffinose	0,628 ± 0,005 ^{B*}	0,648 ± 0,007 ^{B*}	0,678 ± 0,009 ^A	
	Sacarose	0,612 ± 0,009 ^{B*}	0,650 ± 0,009 ^{A*}	0,654 ± 0,007 ^{A*}	
	Lactose	0,622 ± 0,008 ^{B*}	0,638 ± 0,007 ^{B*}	0,678 ± 0,007 ^A	
WOB	Trehalose	0,794 ± 0,006 ^A	0,789 ± 0,005 ^{AB*}	0,774 ± 0,007 ^{B*}	0,819 ± 0,006
	Raffinose	0,760 ± 0,007 ^{B*}	0,778 ± 0,006 ^{B*}	0,802 ± 0,007 ^A	
	Sacarose	0,732 ± 0,008 ^{B*}	0,782 ± 0,008 ^{A*}	0,790 ± 0,006 ^{A*}	
	Lactose	0,746 ± 0,007 ^{C*}	0,770 ± 0,006 ^{B*}	0,803 ± 0,006 ^A	
ALH	Trehalose	1,1 ± 0,04 ^A	0,986 ± 0,03 ^B	1,0 ± 0,04 ^{AB}	1,0 ± 0,04
	Raffinose	1,0 ± 0,04 ^A	0,948 ± 0,03 ^A	0,995 ± 0,05 ^A	
	Sacarose	0,978 ± 0,02 ^A	1,0 ± 0,03 ^A	1,0 ± 0,03 ^A	
	Lactose	0,984 ± 0,02 ^B	1,1 ± 0,03 ^A	0,950 ± 0,02 ^B	
BCF	Trehalose	23,8 ± 0,3 ^{AB}	24,2 ± 0,3 ^A	23,2 ± 0,3 ^{B*}	24,7 ± 0,4
	Raffinose	22,9 ± 0,4 ^{B*}	22,3 ± 0,4 ^{B*}	24,2 ± 0,4 ^A	
	Sacarose	23,3 ± 0,4 ^{A*}	24,1 ± 0,4 ^A	23,4 ± 0,4 ^{A*}	
	Lactose	24,0 ± 0,5 ^A	24,7 ± 0,4 ^A	24,3 ± 0,4 ^A	

Distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), Velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), funcionalidade de membrana (Membrana), funcionalidade mitocondrial (Mitocôndria), fluidez de membrana (Fluidez), espécies reativas de oxigênio (ROS) e integridade de DNA (DNA), lactose 50, 100 e 150 mM, rafinose 50, 100 e 150 mM. Letras diferentes na mesma linha diferença estatística (P < 0.05) entre as concentrações, * diferença estatística (P < 0.05) com relação ao controle.

4. Considerações Finais

O presente possibilitou o amplo conhecimento das técnicas de criopreservação de esperma de peixe, bem como a importância de seu uso para fins científicos ou comerciais, além de compreender características biológicas e ecológicas do Curimba como modelo biológico para pesquisas.

No primeiro experimento verificamos o uso de amidas DMF e DMA nas concentrações de 2, 5, 8 e 11% como crioprotetores de esperma curimba, onde o DMF nas concentrações 2% e 8% apresentaram os melhores resultados, provando que pode ser usado na criopreservação diminuindo os danos celulares.

No segundo experimento analisamos os açúcares trealose, sacarose, lactose e rafinose nas concentrações 50, 100 e 150 mM, como crioprotetores para esperma de curimba. A trealose 100 mM adicionado ao BTS com 10% de DMSO, foi o açúcar que apresentou o melhor resultados para a criopreservação espermática de Curimba, *Prochilodus lineatus*,

Conclui-se que a procura do crioprotetor que mantenha a qualidade da célula espermática pós-congelamento, é de grande importância para aquicultura como também para preservação de espécies em extinção e repovoamento de rios e lagos. Desta forma esse estudo teve a intenção de encontrar opções de crioprotetores com qualidade para armazenamento da célula espermática, constatando que ainda serão necessários novos estudos com outros crioprotetores, bem como outras concentrações.

Referências

AHN, J.Y., PARK, J.Y., LIM, H.K. Effects of different diluents, cryoprotective agents, and freezing rates on sperm cryopreservation in *Epinephelus akaara*. **Cryobiology**, v.83, p.60–64, 2018.

AISEN, E.G., MEDINA, V.H., VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p.1801–1808, 2002.

ASTURIANO, J.F., CABRITA, E., HORVÁTH, A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v.1245, p.69–76, 2016.

BARROCA, T.M., GUTIÉRREZ-ESPINOSA, M.A., GIRALDO, A. BEDORE, A.G., GODINHO, A.L. Coded wire tagging of juvenile curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes): mortality, tag retention, and growth. **Neotrop. Ichthyol**, v.13, p.383-388, 2015. 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, p.189–195, 2001.
- CHEUQUEMÁN, C., FAÚNDEZ, R., SÁNCHEZ, R., & RISOPATRÓN, J. Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. **Andrologia**, v.50, p.e13080, 2018.
- CIERESZKO, A., DIETRICH, G.J., WOJTCZAK, M., SOBOCKI, M., HLIWA, P., KUŹMIŃSKI, H., DOBOSZ, S., SŁOWIŃSKA, M., NYNCA, J. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) semen from Lake Łebsko, Poland. **Fundamental and Applied Limnology/Archiv Für Hydrobiologie**, v.173, p.59–65, 2008.
- COSSON, J. The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa. **Aquaculture International**, v.12, p.69–85, 2004.
- DIOGO, P., MARTINS, G., EUFRÁSIO, A., SILVA, T., CABRITA, E., GAVAIA, P. Selection Criteria of Zebrafish Male Donors for Sperm Cryopreservation. **Zebrafish**. v.16, p.189-196, 2018.
- ELLIOTT, G.D., WANG, S., FULLER, B.J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v.76, p.74–91, 2017.
- ESCHMEYER, W.N., FRICKE, R., VAN DER LAAN, R., editors. Catalog of fishes: genera, species, references. San Francisco: **California Academy Science**; 2016. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain>
- FAI, P.B.A., KINFACK, J.S.T., TOWA, Y.J.T. Acute effects of binary mixtures of Type II pyrethroids and organophosphate insecticides on *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v.26, p.889-901, 2017.
- FULTON, T.W., The rate of growth of fishes. 20th Annual Report of the Fishery Board of Scotland, v.3, p.326-446, 1904.
- GALLEGO, V., ASTURIANO, J.F. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. **Reviews in Aquaculture**. v.11, p.697-724, 2018.
- 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.
- GERBER, L.R., MANCHA-CISNEROS, M.D.M., O'CONNOR, M.I., SELIG, E.R. Climate change impacts on connectivity in the ocean: implications for conservation. **Ecosphere**, v.5, p.1-18, 2014.
- LAHNSTEINER, F. & PATZNER, R.A. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds): Fish Spermatology, pp. 1–61. **Alpha Science International Ltd**, Oxford, UK, 2008.

- MACHADO, G.J., MURGAS, L.D.S., PALHARES, P.C., ASSIS, I.L., CASTRO, T.F.D. Cooling of curimba (*Prochilodus lineatus*) embryos using different concentrations of dimethyl sulphoxide and methanol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.48, 2019.
- MAGNOTTI, C., CERQUEIRA, V., LEE-ESTEVEZ, M., FARIAS, J.G., VALDEBENITO, I., FIGUEROA, E. Cryopreservation and vitrification of fish semen: A review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, v.10, p.15–25, 2018.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., DIOGO, P., DINIS, M.T., SOARES, F., SARASQUETE, C., CABRITA, E. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v.66, p.333–338, 2013.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., HORVÁTH, Á., LABBÉ, C., ZHANG, T., ROBLES, V., HERRÁEZ, P., SUQUET, M., ADAMS, S., VIVEIROS, A., TIERSCH, T.R., CABRITA, E. Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, v.472, p.156–177, 2017.
- 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.
- MURGAS, L.D.S., FELIZARDO, V.O., FERREIRA, M.R., ANDRADE, E.S., VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.186-191, 2011.
- MURGAS, L.D.S., FELIZARDO, V.O., FERREIRA, M.R., VERAS, G.C., ANDRADE, E.S., PAULA, D.A.J. Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Ciência Animal**, v.22, p.197-206, 2012.
- MURGAS, L.D.S., GUALHANONE, A., SILVA, M.O.B., MELLO, C.B., FREITAS, R.T.F., ZANGERONIMO, M.G. Calidad seminal del pez piraicanjuba (*Birichthys orbignyanus*) post-descongelación. **Revista Anales Veterinária**, v.17, p.3-10, 2001.
- NINHAUS-SILVEIRA, A., FORESTI, F., DE AZEVEDO, A., AGOSTINHO, C.Â., VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v.17, p.45–55, 2008.
- PAULA, D.A.J., ANDRADE, E.S., MURGAS, L.D.S., FELIZARDO, V.O., WINKALER, E.U., ZEVIANI, W., FREITAS, R.T.F. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v.10, p.661–665, 2012.
- PAULA, D.A.J., MACHADO, M.R.F., MURGAS, L.D.S., RABELO, D., ZANGERÔNIMO, M.G., REIS NETO, R.V., ANDRADE, E.A. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v.12, p.835–844, 2014.

- ROUTRAY, P., VERMA, D.K., SARKAR, S.K., SARANGI, N. (2007). Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.33, p.413–427, 2007.
- RURANGWA, E., KIME, D., OLLEVIER, F., NASH, J. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1–28, 2004.
- SIEME, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, 169, 2–5. Doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.004.
- SILVA, H.V.R., SILVA, A.R., SILVADA, L.D.M., COMIZZOLI, P. (2018). Semen Cryopreservation and Banking for the Conservation of Neotropical Carnivores. **Biopreservation and Biobanking**. Doi:10.1089/bio.2018.0104.
- TSAI, S., Lin, C. (2012). Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 55, 425–434. Doi:10.1590/s1516-89132012000300014.
- VARELA JUNIOR, A.S., GOULARTE, K.L., ALVES, J.P., PEREIRA, F.A., SILVA, E.F., CARDOSO, T.F., JARDIM, R.D., STREIT, DP JR., CORCINI, C.D. (2015). Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Anim. Reprod. Sci.**, 157, 71–77. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.03.017.
- VETTORAZZI, Myara (2012) Characterization of lane snapper (*Lutjanus synagris*) semen using the Computer Assisted Semen Analysis. **Ciencia Animal**, 22, 698-701.
- VIVEIROS, A., MARIA, A.N., AMARAL, T.B., ORFÃO, L.H., ISAU, Z.A., VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. (2012). Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, 43, 546-555. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02860.x.
- VIVEIROS, A.T.M., LEAL, M.C., FRANÇA, T.S., ALMEIDA, I.L.G., ISAÚ, Z.A. (2016). Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. **Animal Reproduction Science**, 173, 73–79. Doi:10.1016/j.anireprosci.2016.08.014.
- VIVEIROS, A.T.M., NASCIMENTO, A.F., LEAL, M.C., GONÇALVES A.C.S., ORFÃO, L.H., COSSON, J. (2015). 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 Physiol Biochem**. 41, 193-201. Doi:10.1007/s10695-014-0016-7.