

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EDUARDO THOMÉ NICOLETI

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL  
DE *Leirius marmoratus***

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL  
DE *Leirius marmoratus***

**EDUARDO THOMÉ NICOLETI**

Zootecnista/Universidade Federal de Santa Maria

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em  
Zootecnia  
Área de concentração: Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil

Março de 2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Nicoletti, Eduardo Thomé  
DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO  
SEMINAL DE *Leiarius marmoratus* / Eduardo Thomé  
Nicoletti. -- 2024.  
72 f.  
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..

Coorientador: Rômulo Batista Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Pimelodidae. 2. metanol. 3. análise cinética. 4.  
sêmen. 5. peixes. I. Streit Jr., Danilo Pedro, orient.  
II. Rodrigues, Rômulo Batista, coorient. III. Título.

Eduardo Thomé Nicoletti  
Zootecnista

## DISSERTAÇÃO

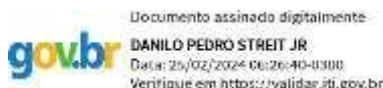
Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 28.03.2024  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 22/05/2024  
Por

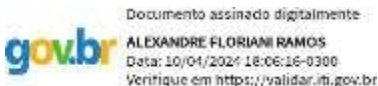


Danilo Pedro Streit Jr.  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

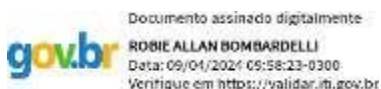
Ines Andretta

Assinado de forma digital por Ines  
Andretta  
Dados: 2024.05.22 15:16:07 -0300

INES ANDRETTA  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia



Alexandre Floriani Ramos  
EMBRAPA

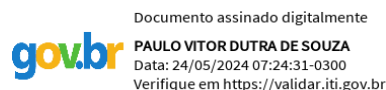


Robie Allan Bombardelli  
UNIOESTE

VICTOR |  
GALLEGO |  
ALBIACH

Firmado digitalmente  
por VICTOR |  
GALLEGO | ALBIACH  
Fecha: 2024.04.11  
18:04:00 +02'00'

Victor Gallego Albiach  
UPV/Espanha



PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
Vice-Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## **Agradecimentos**

Primeiramente, quero agradecer a Deus, por Ele estar sempre comigo, por ter dado a minha família que é meu bem mais precioso.

A minha família, e aos meus pais, Sidnei Nicoleti e Marlisete Thomé, muito obrigado, por estarem do meu lado sempre, ensinando-me a ser melhor todos os dias e me motivando a nunca desistir e lutar pelos meus sonhos, deixo aqui a minha eterna gratidão, eu amo vocês.

Ao meu orientador Danilo Pedro Streit Jr, pelos ensinamentos, pelos conselhos e por ter aceito ser meu orientador nesse período, me acolhendo dentro do AQUAM. Ao meu coorientador Rômulo Batista Rodrigues, pelas orientações acadêmicas e apoio oferecido em todos os momentos que precisei, isso foi extremamente importante para me ajudar nessa experiência e no desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao Jhony Lisboa, Nathalia Teixeira, Larise Lima, Louise Spica, Karel Lozano e Thaiza Freitas que me auxiliaram durante a realização deste trabalho. À Tales Fabris, Larise Lima, Renata Dantas, Jhony Lisboa, Nathalia Teixeira e Karel Lozano pela amizade; e a todos do AQUAM pelo acolhimento e amizade, que foram essenciais nesta caminhada.

Agradeço a Pirai Piscicultura, em especial a Rodrigo Kasai, por ter cedido espaço em sua propriedade para realização experimental e também pela grande transferência de conhecimentos.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela estrutura, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte para a realização deste trabalho.

Agradeço a banca avaliadora desta dissertação, pela disponibilidade, sugestões e contribuições com o aprendizado.

A todos meus amigos que mesmo de longe, me incentivaram e me apoiaram neste desafio.

Obrigado a todos, do fundo do meu coração, por estarem presente nesses dois anos de conquistas e aprendizado, sem vocês isso tudo não teria sido alcançado.

## DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE *Leiarius marmoratus*<sup>1</sup>

Autor: Eduardo Thomé Nicoletti

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr

Coorientador: Rômulo Rodrigues Batista

**Resumo:** A presente pesquisa avaliou desenvolver um protocolo de criopreservação espermática de *L. marmoratus* padronizado para servir tanto na produção de híbridos como na conservação ex situ da espécie. Vinte três machos (n=23) foram distribuídos em quatro experimentos onde amostras de sêmen foram coletadas, criopreservadas e submetidas a análises após seu descongelamento. O primeiro teste verificou qual o crioprotetor permeável juntamente com metodologia de descongelamento apresentou melhor desempenho sobre as amostras seminais da espécie. O segundo experimento, utilizando as melhores amostras do primeiro e segundo teste, verificou a ação de diferentes tempos de permanência em vapor de nitrogênio sobre o material criopreservado. O terceiro experimento verificou qual a concentração do melhor crioprotetor permeável apresenta os melhores resultados após descongelamento. Por fim, o último teste verificou qual o melhor crioprotetor impermeável apresenta melhor desempenho em conjunto ao crioprotetor permeável. As amostras de sêmen foram diluídas no meio testado (1:4), depois congeladas em recipiente com vapor de nitrogênio e armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C. Os parâmetros de cinética, avaliados em todos os experimentos, pós-descongelamento foram realizados pelo sistema CASA e os resultados de análise de integridade da membrana (foi realizada no último experimento) foi obtido através de microscopia de fluorescência. Como resultado foi possível observar que: o tempo de 2 horas em vapor de nitrogênio não alterou a qualidade das amostras criopreservadas; as metodologias de 45 °C por 5 segundos e 40 °C por 8 segundos podem ser empregadas no descongelamento de amostras da espécie; o Metanol sem o uso da combinação de um crioprotetor impermeável, apresentou no geral, os melhores resultados nas análises cinéticas e na integridade de membrana. Assim, os testes in vitro mostraram que o Metanol pode ser empregado na criopreservação seminal de *L. marmoratus*, podendo ser utilizado no desenvolvimento de um banco de germoplasma ou em sistemas de produção de peixes brasileiros.

**Palavras-chave:** Pimelodidae; metanol; análise cinética; sêmen; peixes.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (p.72) Março, 2024.

## DEVELOPMENT OF A SEMINAL CRYOPRESERVATION PROTOCOL OF *Leiarius marmoratus*<sup>1</sup>

Author: Eduardo Thomé Nicoletti

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr

Co-supervisor: Rômulo Rodrigues Batista

**Abstract:** The present research evaluated the development of a standardized *L. marmoratus* sperm cryopreservation protocol to serve both in the production of hybrids and in the ex situ conservation of the species. Twenty three males (n=23) were distributed in four experiments where semen samples were collected, cryopreserved and subjected to analysis after thawing. The first test verified which permeable cryoprotectant together with the thawing methodology performed better on the seminal samples of the species. The second experiment, using the best samples from the first and second tests, verified the action of different residence times in nitrogen vapor on the cryopreserved material. The third experiment verified which concentration of the best cryoprotectant permeable presents the best results after thawing. Finally, the last test verified which the best waterproof cryoprotectant performs best together with the permeable cryoprotectant. The semen samples were diluted in the tested medium (1:4), then frozen in a container with nitrogen vapor and stored in liquid nitrogen at -196 °C. The kinetic parameters, evaluated in all experiments, post-thawing was performed by the CASA system and the results of membrane integrity analysis (it was performed in the last experiment) were obtained through fluorescence microscopy. As a result, it was possible to observe that: the 2 hour period in nitrogen vapor did not change the quality of the cryopreserved samples; the methodologies of 45 °C for 5 seconds and 40 °C for 8 seconds can be used to thaw samples of the species; Methanol without the use of a combination of an impermeable cryoprotectant, generally presented the best results in kinetic analyzes and membrane integrity. Thus, in vitro tests showed that Methanol can be used in the seminal cryopreservation of *L. marmoratus*, and can be used in the development of a germplasm bank or within Brazilian fish production.

**Keywords:** Pimelodidae; methanol; kinetic analysis; semen; fish.

---

<sup>1</sup> Masters dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ( p.72) March, 2024.

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Indução hormonal reprodutiva em um exemplar de *Leiarius marmoratus*. 16
- Figura 2.** Coleta seminal de *Leiarius marmoratus*, usando uma seringa..... 18
- Figura 3.** Esquema que demonstra os parâmetros analisados e estimados pelo software CASA..... 20
- Figura 4.** Exemplar macho de jundiá amazônico, *Leiarius marmoratus* adulto ..... 21

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Experimento 1 - Teste de diferentes soluções crioprotetoras e diferentes temperaturas de descongelamento em sêmen criopreservado de *Leiarius marmoratus* ..... 28
- Figura 2.** Experimento 3 – Sêmen de *Leiarius marmoratus* submetido em diferentes crioprotetores permeáveis com diferentes concentrações ..... 29
- Figura 3.** Experimento 4 - Teste de diferentes soluções crioprotetoras com diferentes combinações em sêmen de *Leiarius marmoratus*..... 30
- Figura 4.** Experimento 4 - Sêmen de *Leiarius marmoratus* testado apenas com crioprotetores permeáveis ou combinado com crioprotetores impermeáveis..... 37
- Figura 5.** Efeito de diferentes tempos de armazenamento em vapor de nitrogênio na cinética espermática..... 39
- Figura 6.** Efeito de diferentes concentrações de crioprotetores permeáveis na cinética espermática..... 41
- Figura 7.** Análise da motilidade e viabilidade celular após criopreservação com diferentes soluções crioprotetoras..... 42
- Figura 8.** Cinética espermática após criopreservação com diferentes soluções crioprotetoras ..... 43
- Figura 9.** Cinética espermática após criopreservação com combinações de diferentes soluções crioprotetoras..... 44



## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
µL	Microlitro
VCL	Velocities curvilinear
VAP	Average path
VSL	Straight-Line
STR	Straightness
BCF	Beat Cross Frequency
WOB	Wobble
%	Porcentagem
Kg	Quilograma
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMA	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
°C	Grau Celsius
Seg	Segundos
Min	Minutos
mM	Milimolar
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
BTS	Beltsville Thawing Solution

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 Cenário da aquicultura no Brasil.....	14
2.2 Métodos reprodutivos de espécies nativas.....	15
2.3 Criopreservação .....	16
2.4 Criopreservação de sêmen em peixes .....	18
2.5 Avaliação da motilidade seminal .....	19
2.6 <i>Leiarius marmoratus</i> .....	21
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 Objetivo geral .....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>25</b>
<b>2. Material e métodos</b> .....	<b>26</b>
2.1. Localização, seleção dos reprodutores, alimentação e qualidade de água .....	26
2.2. Indução hormonal e coleta de amostras.....	27
2.3. Desenho experimental .....	27
2.4 Experimento 1 e 2 .....	28
2.5 Experimento 3 .....	29
2.6 Experimento 4 .....	31
2.7 Análises de amostras após descongelamento .....	32
2.7.1 Parâmetros cinéticos (CASA) .....	32
2.7.2 Integridade de membrana.....	33
2.8 Análise estatística.....	34
<b>3. Resultados</b> .....	<b>35</b>
3.1. Experimento 1 .....	36
3.2. Experimento 2 .....	38
3.3. Experimento 3 .....	40
3.4. Experimento 4 .....	41
<b>4. Discussão</b> .....	<b>44</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>49</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>49</b>
<b>Declaração de interesses</b> .....	<b>49</b>
<b>Fontes de financiamento</b> .....	<b>49</b>
<b>Referências</b> .....	<b>49</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>APÊNDICE 1 - Aquaculture - Guide for Authors</b> .....	<b>62</b>
<b>APÊNDICE 2 – CERTIFICADO CEUA</b> .....	<b>71</b>
<b>VITA</b> .....	<b>72</b>

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de pescado é a maior entre todos os países da América do Sul, com perspectiva de aumento nos números produtivos, de acordo com os últimos relatórios da FAO (2020). Segundo dados da Peixe BR (2024), a produção aproximada da piscicultura no Brasil no ano de 2023 foi de 887 mil toneladas, com um crescimento de 3,1% sobre a produção do ano de 2022, sendo 29,7% desse montante representado por peixes nativos.

Com a queda de 3,3% na produção de espécies nativas no ano de 2023 em comparação a 2022 (Peixe BR, 2024), evidência que a produção e manejo destas espécies ainda enfrentam adversidades. Elas estão relacionadas com problemas envolvendo questões sanitárias, legalização da produção, industrialização, ampliação de novos mercados e reprodução dos animais em cativeiro. Este último item é um dos principais desafios na piscicultura comercial, uma vez que as espécies nativas apresentam técnicas singulares e requerem condições específicas para sua reprodução (Garcez *et al.*, 2021).

Com o intuito de alavancar a cadeia produtiva dos peixes nativos, algumas técnicas podem ser empregadas na piscicultura a fim de auxiliar de forma prática a produção destas espécies de interesse comercial, ecológico e potencial econômico. A criopreservação de sêmen é um exemplo de técnica que pode ser utilizada, sendo um procedimento essencial para aperfeiçoar a conservação do material genético de espécies com importância econômica e ecológica (Figueroa *et al.*, 2016). Também pode ser empregada na conservação da biodiversidade e preservação do sêmen de animais ameaçados de extinção e na otimização do manejo de machos geneticamente superiores (Dietrich *et al.*, 2017; Nynca *et al.*, 2015; Cabrita *et al.*, 2010).

Esta metodologia assegura inúmeras vantagens, tais como, praticidade no manejo dos reprodutores, já que é possível trabalhar com machos e fêmeas em momentos distintos; facilidade no transporte do material genético; a redução de problemas causados por assincronia da maturidade gonadal entre fêmeas e machos; estabelecer programas de hibridização com peixes de diferentes locais e períodos reprodutivos (Maria *et al.*, 2009; Martínez-Páramo *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2009).

Para a obtenção de bons resultados na criopreservação são utilizadas soluções crioprotetoras específicas com o intuito de atuar como um meio substituto da água presente no meio intracelular, onde através de gradiente osmótico, realizam a

desidratação parcial da célula, diminuindo assim o ponto de congelamento e reduzindo a formação de cristais de gelo nas camadas internas e externas da célula (Rosato & Iaffaldano, 2013; Neves, 2008; Robles *et al.*, 2003). Estas soluções apresentam função de proteção contra a exposição à baixas temperaturas no meio em que as células são submetidas, contudo, estas podem vir a causar danos osmóticos e toxicidade celular (Guan *et al.*, 2010).

Dentre as inúmeras espécies nativas brasileiras que podem ser destinadas a prática da criopreservação de sêmen, o *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) é um peixe de couro que possui boa adaptação nos sistemas de produção, facilidade de consumo de dietas secas e baixas taxas de canibalismo (Mateo & Rojas, 2005). Esta espécie vem recebendo muita atenção dos piscicultores brasileiros para a produção comercial de híbridos através da sua reprodução com *P. reticulatum*, produzindo o híbrido conhecido como Jundiara (Barros *et al.*, 2020).

Diante desse contexto, a criopreservação seminal da espécie poderia auxiliar no manejo reprodutivo em cativeiro, diminuindo os problemas relacionados a assincronia entre machos e fêmeas, que é notado nesta espécie. Algumas pesquisas já foram realizadas visando o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação seminal para o jundiá amazônico (Borges *et al.*, 2020; Gheller *et al.*, 2019), contudo, os resultados obtidos ainda são inconsistentes e ajustes no protocolo são necessários para o sucesso da criação de bancos seminais da espécie.

Assim é necessário a busca pela diminuição de fatores que possam reduzir a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides após a realização da criopreservação espermática. Para espécies de interesse comercial e potencial econômico, como o caso do *L. marmoratus*, estes estudos podem vir a servir para a conservação de material genético da espécie e favorecer sua produção e comercialização dentro do cenário dos peixes nativos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cenário da aquicultura no Brasil

A aquicultura brasileira teve início por volta da década de 30, tendo um crescimento gradativo ao longo dos anos (LEITE *et al.*, 2013). O potencial hídrico do Brasil e a grande variação de ambientes aquáticos, lhe atribui uma grande riqueza e abundância de espécies, algumas já com grande destaque no mercado nacional, como *Colossoma macropomum*. Contudo, a observação de HAZIN (2006) que tem quase duas décadas, que inúmeras espécies de peixes que sequer foram identificadas e, conseqüentemente, a capacidade zootécnica da ictiofauna nativa é subestimada, ainda é bastante atual.

Em contrapartida, como mostra o relatório da FAO (2016), diversos estudos e investimentos vêm sendo aplicados para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas e manejo produtivo dos peixes, com estatísticas que apontam um crescimento de até 104% na produção aquícola nos próximos anos no território brasileiro. Segundo Sonoda *et al.* (2012), outro ponto importante para alavancar a produção está voltado para a demanda dos consumidores de pescado e como ela se relaciona com outros tipos de proteínas e alimentos, o que é fundamental para garantir um aumento do consumo de peixes.

Com esse enorme potencial, o Brasil ainda pode contribuir mais para a produção mundial de pescado, quando levado em consideração seus recursos hídricos e terrestres (FAO, 2018). Segundo a Peixe BR (2024), houve crescimento significativo da atividade, com diminuição da participação dos peixes nativos em 2023. As dificuldades de comercialização impostas pela pandemia podem responder por parte da queda na produção de peixes nativos, que ocorreu em 2021, mas que voltou a crescer no ano de 2022 (Peixe BR, 2023) e que devido questões climáticas e também sanitárias voltou a cair em 2023 (Peixe BR, 2024). Produtores de algumas regiões, como o Sudeste, têm investido em tecnologia e ampliado os sistemas de produção para piscicultura, principalmente nos estados de São Paulo e de Minas Gerais, onde a produção de espécies nativas e da tilápia, cresceram 86,4% e 104,6%, respectivamente, entre 2014 e 2018 (FAO, 2018).

É importante ressaltar que o Brasil ainda passa por um período de profissionalização nesta atividade voltada para a industrialização (FAO, 2018) e

grande parte dessas técnicas estão relacionadas principalmente à nutrição, sanidade, domesticação de espécies nativas, reprodução induzida e o manejo dentro das propriedades (Lima, 2014).

## 2.2 Métodos reprodutivos de espécies nativas

O Brasil detém um grande potencial hídrico que permite reunir uma extensa variedade de espécies nativas classificadas como espécies neotropicais, que por sua vez possuem diferentes estratégias reprodutivas (Galo *et al.*, 2015). Diversas espécies neotropicais migram rio acima durante a reprodução (reofílicas), nadando para águas mais calmas para realizar a desova. Esse episódio, chamado de piracema, ocorre como resposta a sinais do ambiente, temperatura, chuva e fotoperíodo, que desencadeiam a maturação dos gametas (Godinho *et al.*, 2007).

As espécies reofílicas não se reproduzem naturalmente fora de seu habitat natural, pois não recebem a estimulação necessária para resultar em uma resposta endócrina, e apenas desenvolvem parcialmente suas gônadas (Murgas *et al.*, 2011). Com isso, para que ocorra o desenvolvimento gonadal adequado em cativeiro, é preciso que ocorra intervenção manual, simulando condições ambientais favoráveis à reprodução (Ribeiro & Moreira, 2014). A utilização de hormônios (Ribeiro & Moreira, 2014), como os extratos brutos de pituitária de *Cyprinus carpio*, são considerados os mais comuns nessa etapa da indução reprodutiva (Colpo *et al.*, 2011).

A reprodução artificial da maioria das espécies nativas é otimizada pelo uso da indução hormonal (Figura 1). Ela possibilita a maturação final e liberação dos gametas de peixes mantidos em cativeiro, além de aumentar a eficiência da reprodução em condições laboratoriais (Carneiro, 2007). Esta técnica também pode ser utilizada para aumentar a produção seminal, antecipar o período reprodutivo, restringi-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote de matrizes (Andrade & Yasui, 2003).

No Brasil, o hormônio mais utilizado para realização da indução da reprodução pela maturação final de peixes é o extrato bruto de hipófise de *C. carpio* (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004). A indução hormonal com extrato hipofisário nos machos, em algumas espécies, é importante por possibilitar o aumento do volume de sêmen obtido, facilitando os procedimentos da reprodução em laboratório e permitindo a utilização de um menor número de machos. Isso possibilita a redução do plantel de reprodutores e dos custos de produção (Carneiro, 2007).



**Figura 1.** Indução hormonal reprodutiva em um exemplar de *Leiarius marmoratus*. **Fonte:** Autor, 2024.

Outra alternativa para a indução reprodutiva em peixes é a combinação de hormônios liberadores de gonadotrofinas (mGnRHa e sGnRHa) e bloqueadores dos receptores de dopamina (pimozida, domperidona e metoclopramida), denominados inibidores de GnRHa + dopamina (Araújo *et al.*, 2014). Dentre esses indutores hormonais, o Ovopel® foi desenvolvido pela Universidade de Godollo, Hungria, e é conhecido como regulador do hormônio luteinizante ou seus análogos superativos (Das, 2004).

Martins (2011) avaliou a reprodução de machos e fêmeas de *C. macropomum*, submetidos à indução hormonal com Extrato de Hipófise de Carpa e Ovopel® e observou que o indutor hormonal Ovopel® pode ser utilizado em substituição ao protocolo tradicional com Extrato de Hipófise de Carpa. Foi verificado que os parâmetros avaliados em ambos os sexos foram semelhantes entre os indutores testados. Outro hormônio substituto ao extrato hipofisário a ser citado é o Ovaprim®, que utiliza o próprio sistema endócrino dos peixes para induzir a maturação de forma segura, possibilitando coordenar as datas das desovas (Carvalho, 2016). Seu uso é indicado para induzir a maturação dentro de um período, para antecipar a data da desova e também aumentar a produção seminal e contagem de células espermáticas (Carvalho, 2016).



## 2.3 Criopreservação

A criopreservação pode ser definida como a conservação da viabilidade de tecidos e de células em baixas temperaturas no estado de quiescência, promovendo o cessamento das reações bioquímicas e possibilitando, após o aquecimento, a restauração das atividades metabólicas (Cheuiche *et al.*, 2011). Segundo Sztein *et al.* (2018), o início dessa ciência deu-se em 1776 quando Lazzaro Spallanzani descreveu a sobrevivência de espermatozoides de seres humanos, cão, touro, cavalo, sapo e salamandra em ambientes quentes e frios. Mais tarde, Polge *et al.* (1949) publicou o primeiro estudo com criopreservação seminal de uma espécie animal, no caso com aves

Os materiais biológicos geralmente são estocados em ultrafreezers (-80 °C), suspensos em botijões de vapor de nitrogênio líquido (-170 °C) ou até mesmo imersos em nitrogênio líquido (-196 °C), sendo o último método o mais utilizado. Em temperaturas tão baixas, os níveis de energia cinética são demasiadamente baixos para permitir o movimento das moléculas, promovendo a conservação do material criopreservado (Grout *et al.*, 1990). Esta técnica é essencial para o armazenamento e disponibilidade de recursos genéticos (Matthews *et al.*, 2018).

Para realização da criopreservação, são utilizadas soluções crioprotetoras, com o intuito de proteger as células e tecidos durante a diminuição da temperatura (Guan *et al.*, 2010). Estas soluções apresentam como funções a retirada de água, existente no meio intracelular, por meio de gradiente osmótico, através da desidratação parcial da célula, reduzindo o limiar de congelamento e evitando a criação de cristais de gelo no interior das células (Rosato & Iaffaldano, 2013).

Os agentes crioprotetores podem ser divididos em dois grupos em razão da sua capacidade de penetrar nas membranas celulares (Elliot *et al.*, 2017; Xin *et al.*, 2017). Os crioprotetores classificados como não permeáveis são aquelas substâncias que tem alto peso molecular. Supõe-se que essas moléculas não conseguem penetrar no interior da célula, mas promovem a ação protetora de forma externa. Por serem compostos hidrofílicos, eles se ligam as moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução e diminuindo a formação de cristais de gelo (Fahy, 2007).

Já os crioprotetores permeáveis (internos) são, em teoria, substâncias com alta solubilidade em água e de baixo peso molecular, podendo penetrar a membrana celular e desempenhar sua ação crioprotetora por todo o citoplasma e organelas,

limitando a temperatura de congelamento intracelular, logo, suprimindo a formação de cristais de gelo (Hubálek, 2003). Um agente crioprotetor permeável deve apresentar como características o baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta capacidade de atravessar a membrana celular (Fahy, 2010).

#### 2.4 Criopreservação de sêmen em peixes

O primeiro estudo que obteve êxito com a criopreservação de sêmen de peixes foi em 1953, com sêmen de arenque (Blaxter, 1953). Ao longo das últimas décadas as metodologias de criopreservação de sêmen de peixes evoluíram, aumentando assim, o número de potenciais aplicações. Na aquicultura, esta prática visa proporcionar o melhor aproveitamento dos reprodutores nas propriedades que produzem alevinos; conservar a genética de animais selecionados por um programa de melhoramento genético; e solucionar problemas de assincronia entre machos e fêmeas na maturação final dos gametas (Asturiano *et al.*, 2017).

A criopreservação seminal possui algumas etapas obrigatórias, como: coleta do sêmen (Figura 2); diluição do sêmen em um extensor; tempo de equilíbrio térmico ou no crioprotetor; congelamento; armazenamento congelado. Cada etapa citada é de suma importância, pois a falha em qualquer fase do procedimento pode levar a erros no resultado da técnica (Tiersch, 2001).



**Figura 2.** Coleta seminal de *Leiarius marmoratus*, usando uma seringa. **Fonte:** Autor, 2024.

Para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação, deve ser selecionada uma solução extensora, com a finalidade de impedir a ativação imediata

da motilidade espermática, atuando na proteção das células e fornecendo os nutrientes a elas. Além disso, possuem a função de diluir a amostra até a concentração esperada de espermatozoides e atuar como um meio transportador para os crioprotetores necessários durante a criopreservação (Yang *et al.*, 2016).

Na atividade de conservação de gametas masculinos, o dimetilsulfóxido (DMSO) vem sendo considerado o crioprotetor mais eficiente para a maioria das espécies (Suquet *et al.*, 2000). No entanto, outros crioprotetores já mostram bons resultados na criopreservação do sêmen de peixes. Muitos detalhes são cruciais e poderão influenciar na qualidade dos espermatozoides após o descongelamento, como a formação de gelo extra e intracelular no decorrer dos processos de congelamento e descongelamento seminal (Gao & Critser, 2000).

A criopreservação seminal possibilita algumas vantagens, uma delas é a possibilidade de transporte de gametas para diferentes locais. Com isso, evita-se o transporte de animais, que pode influenciar nos seus parâmetros de qualidade seminal (Cabrita *et al.*, 2010). Outro ponto positivo da utilização da técnica, é o armazenamento de germoplasma, o que acaba permitindo a conservação de características de interesse na espécie foco de determinado estudo (Cabrita *et al.*, 2010). Nesse sentido, a criopreservação serve como uma ferramenta para a produção e estocagem desses materiais genéticos (Tiersch *et al.*, 2011).

## **2.5 Avaliação da cinética espermática**

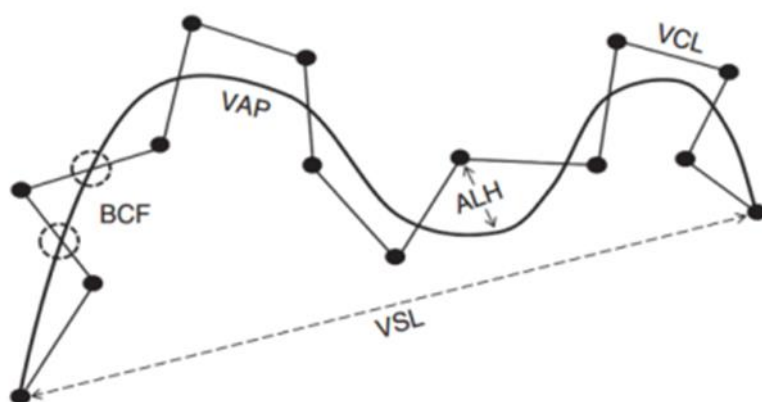
Danos gerados durante o processo de criopreservação pela formação de cristais de gelo, toxicidade dos crioprotetores, flutuação do pH, choque térmico e o efeito da diferença de osmolaridade, são as principais fontes de redução na qualidade espermática (Chao & Liao, 2001). Vale ressaltar que, as características do sêmen variam entre as espécies, o que faz com que análises de qualidade seminal e desenvolvimento de técnicas para caracterizar essa qualidade sejam uma prioridade a ser desenvolvida (Cabrita *et al.*, 2010). Os problemas que podem ser oriundos do processo de criopreservação podem ser analisados com uma diversidade de análises e técnicas.

Uma das técnicas para avaliar os danos e a qualidade do sêmen criopreservado é a motilidade espermática, a qual, geralmente, se correlaciona bem com a fertilidade (Kime *et al.*, 2001). A avaliação da motilidade espermática pode ser realizada de duas

formas, a primeira é a avaliação subjetiva, onde um técnico experiente ou não, avalia a motilidade por meio de uma simples observação utilizando um microscópio óptico. O problema deste método é que os resultados são impactados pela experiência do técnico que realiza a avaliação, podendo ser subestimados ou superestimados (Gallego *et al.*, 2018).

A segunda forma é a avaliação objetiva, onde uma câmera acoplada à um microscópio que grava um vídeo dos espermatozoides em movimento. Esse vídeo é analisado utilizando-se softwares (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA) que capturam as posições das cabeça dos gametas, frame a frame, conseguindo assim calcular as trajetórias e obtendo outras características do movimento. Essa ferramenta foi utilizada primeiramente em sêmen de mamíferos na década de 70 e, somente, na década de 90 o seu uso foi adaptado para estudo dos espermatozoides de peixes (Perchec *et al.*, 1995; Toth *et al.*, 1995).

Após a análise do vídeo esses são os parâmetros e suas respectivas unidades que o software CASA (Figura 3) pode captar e estimar: a) relação entre o número de espermatozoides móveis e imóveis (MOT - %); b) velocidade média do caminho percorrido (VAP -  $\mu\text{m s}^{-1}$ ); c) velocidade curvilínea (VCL -  $\mu\text{m s}^{-1}$ ); d) velocidade em linha reta (VSL -  $\mu\text{m s}^{-1}$ ); e) espermatozoides que realizam movimento progressivo (PRG - %); f) espermatozoides que se movimentam de forma linear (LIN - %); g) índice de oscilação da trajetória (WOB, %); h) amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ) e a i) frequência do batimento de flagelo (BCF – Hz) (Kowalski & Cejko, 2019).



**Figura 3.** Esquema que demonstra os parâmetros analisados e estimados pelo software CASA. Os círculos pretos representam as posições sucessivas da cabeça do espermatozoide durante a gravação do vídeo. VCL – velocidade curvilínea; VAP – velocidade média do caminho; VSL – Velocidade em linha reta; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência do batimento de cauda. **Fonte:** Gallego *et al.*, 2018.

## 2.6 *Leiarius marmoratus*

O jundiá amazônico ou jundiá-onça (Figura 4) (*Leiarius marmoratus*) é um peixe pertencente à família Pimelodidae, na ordem Siluriformes. Esta espécie é encontrada ao longo das bacias do Orinoco e Amazônica (Lundberg & Littmann, 2003), abrangendo a Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e os estados do Amapá, Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima e Pará no Brasil. É uma espécie que habita as camadas mais profundas de rios e lagos, e que prefere se alocar sob pedras e troncos ao fundo durante o dia, possuindo comportamento mais ativo entre o crepúsculo e o alvorecer (Ramírez-Gil & Ajiaco-Martínez, 1997).



**Figura 4.** Exemplar macho de jundiá amazônico, *Leiarius marmoratus* adulto. **Fonte:** Autor, 2024.

É um peixe tropical muito utilizado também na ornamentação devido ao seu padrão de manchas muito admirado pelos aquaristas. De acordo com Baensch & Riehl (1995), como um peixe tropical, a faixa de pH adequada pela espécie situa-se entre 5,8 e 7,2, e temperatura entre 24 e 26°C. É uma espécie de couro que possui boa adaptação nos sistemas de produção, apresenta facilidade de consumo de dietas secas e baixas taxas de canibalismo na fase larval (MATEO & ROJAS, 2005). Esta espécie vem ganhando muita atenção dos piscicultores brasileiros para a produção comercial de híbridos, por meio da sua reprodução com *P. reticulatum*, produzindo o híbrido conhecido como Jundiara (Barros *et al.*, 2020).

Como relatado, o híbrido jundiá amazônico apresenta grande potencial produtivo. Contudo, produtores têm encontrando dificuldades na coleta de sêmen do *L. marmoratus*, sendo necessário em muitos momentos o abate do animal para obtenção de sêmen (Mora & Kossolski, 2006; Castillo *et al.*, 2003). Isso torna a

reprodução desta espécie restrita devido ao limitado número de reprodutores nos plantéis das pisciculturas.

O pequeno volume de sêmen liberado por massagem abdominal pelo *L. marmoratus* pode estar relacionada com a presença de tecido muscular liso de natureza contrátil na porção distal dos testículos, sugerindo a presença de um esfíncter que pode limitar a saída do sêmen pela papila urogenital (Mira *et al.*, 2010). Essa dificuldade na coleta de sêmen aumenta a importância do desenvolvimento de um banco de sêmen criopreservado da espécie para melhorar o manejo reprodutivo, especialmente na produção de híbridos.

### 3. HIPÓTESE

O desenvolvimento um protocolo de criopreservação seminal de *L. marmoratus* possibilitará a manutenção da viabilidade reprodutiva após a criopreservação.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de criopreservação espermática de *L. marmoratus* padronizado para servir tanto na produção de híbridos como na conservação *ex situ* da espécie.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar o crioprotetor permeável e concentração mais adequados para criopreservar o sêmen de *L. marmoratus*;
- Avaliar a combinação entre os crioprotetores permeáveis e crioprotetores impermeáveis em sêmen de *L. marmoratus*;
- Identificar qual a temperatura de descongelamento adequada para o sêmen de *L. marmoratus*;
- Estabelecer o tempo mínimo de armazenamento das amostras de sêmen criopreservadas de *L. marmoratus* em “dry-shipper”.

## **CAPÍTULO II\***

\* Artigo elaborado conforme as normas do periódico Aquaculture



## DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE *Leiarius marmoratus*

**Eduardo Thomé Nicoletti<sup>a</sup>, Rômulo Batista Rodrigues<sup>a</sup>, Jhony Lisboa Benato<sup>a</sup>, Nathalia Dos Santos Teixeira<sup>a</sup>, Louise Nex Spica<sup>b</sup>, Larise Caroline Oliveira Lima<sup>a</sup>, Thaiza Rodrigues de Freitas<sup>a</sup>, Karel Gelina Torres Lozano<sup>a</sup>, Rodrigo Yutaka Dichoff Kasai<sup>c</sup>, Jayme Aparecido Povh<sup>b</sup>, Danilo Pedro Streit Jr.<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Animal Science Research Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup>Animal Science Graduate Program, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>c</sup>Pirai Piscicultura, Terenos, MS, Brasil

\*Autor correspondente: Email: danilo.streit@ufrgs.br; Av. Bento Gonçalves 7712 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, BR 90040-060

### 1. Introdução

O *Leiarius marmoratus* é uma espécie de peixe que pertence a ordem Siluriforme e a família Pimelodidae onde estão distribuídos pelas bacias do Orinoco e Amazonas, podendo atingir mais de 100 cm de comprimento corporal e pesar até 12 kg (Lundberg e Littmann, 2003). Amplamente utilizado em aquarifilia e apreciado na pesca esportiva, *L. marmoratus* também é utilizado na aquicultura brasileira para produzir híbridos interespecíficos com bagres do gênero *Pseudoplatystoma* (Hashimoto *et al.*, 2016; Hashimoto *et al.*, 2012; Campos, 2010).

O objetivo da produção de híbridos ocorre a partir dos aspectos zootécnicos positivos, como: a produção de juvenis com alimentação onívora, redução no custo de produção e aproveitamento da popularidade do *Pseudoplatystoma corruscans* entre os consumidores (Fantini *et al.*, 2019). Mesmo com sua importância comercial, seu destaque na cadeia produtiva de peixes ainda é limitado por alguns motivos, como dificuldades na coleta de sêmen (Mora e Kossowski, 2006; Castillo *et al.*, 2003) e também a falta de sincronia reprodutiva entre fêmeas do gênero *Pseudoplatystoma* e machos de *L. marmoratus* (Galo *et al.*, 2014).

Sendo assim, a formação de um banco de germoplasma para a espécie, atenderia premissas importantes com objetivos zootécnicos. Segundo Maria *et al.* (2009) bancos de germoplasma otimizam a hibridização no cruzamento com peixes com períodos reprodutivos diferentes e Maria e Carneiro (2012) relacionam ainda a facilidade operacional no estabelecimento de programas de melhoramento genético e

conservação da espécie. Contudo, ainda faltam estudos para um protocolo de criopreservação seminal confiável que permita a formação de um banco de germoplasma eficiente, como constataram Gheller *et al.* (2019).

Na literatura é possível encontrar trabalhos que buscaram estabelecer protocolos de criopreservação seminal para a espécie (Borges *et al.*, 2020; Gheller *et al.*, 2019). Entretanto, a falta de padronização nos protocolos de criopreservação seminal bem como resultados pouco consistentes e de baixa replicabilidade, convergem para a necessidade do desenvolvimento de um protocolo confiável para possibilitar a construção de um banco de germoplasma.

Com isso, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de criopreservação seminal para *L. marmoratus*, avaliando a ação de diferentes temperaturas de descongelamento e tempo mínimo de armazenamento em *dry-shipper* e qual o efeito do protocolo sobre os parâmetros seminais após o processo de descongelamento.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Localização, seleção dos reprodutores, alimentação e qualidade da água**

A pesquisa foi conduzida no município de Terenos, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°25'57" S e 55°17'11" W) no período de 06 a 22 de fevereiro de 2023. A metodologia empregada no presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (nº 1083/2019).

Os animais utilizados no experimento foram mantidos em um tanque escavado de aproximadamente 1.000 m<sup>2</sup>, com uma renovação contínua de água, de 10%/dia e uma densidade de 0,2 peixes/m<sup>2</sup>. A alimentação dos reprodutores foi composta por ração (Supra®) carnívoros extrusada com pellet de 14 mm (matéria seca 88%, proteína bruta 40%, extrato etéreo 8%, matéria fibrosa 3%, matéria mineral 13%, cálcio 1.5%, fósforo 1%, energia digestível 3400 kcal/kg), fornecida uma vez ao dia com quantidade equivalente a 1% da biomassa de cada tanque.

Durante o período experimental, as condições ambientais foram temperatura máxima e mínimas de 31,7 e 21,9 °C respectivamente, e a precipitação média de 93 mm (CEMTEC, 2023). Os peixes selecionados para realização do experimento foram transportados para o laboratório de reprodução e alocados em dois tanques de 1.000

L com renovação contínua de água. Nos tanques dentro do laboratório, a água manteve-se a uma temperatura média de  $27,4 \pm 1,2$  °C, com 8,5 mg/L de oxigênio dissolvido e fotoperíodo natural.

## 2.2. Indução hormonal e coleta de amostras

A reprodução induzida foi realizada conforme protocolo adaptado de Borges *et al.* (2020). Os animais selecionados mantidos em laboratório, foram pesados e submetidos à indução hormonal com dosagem única intramuscular de 3,0 mg/kg de peso corporal de extrato bruto de hipófise de carpa (Hoepers®) diluído em 0,25 mL de soro fisiológico/kg de peso corporal de cada animal.

Após um acúmulo térmico de 180 horas-grau posterior à indução (6,7 horas a 27°C), foi realizada a coleta do sêmen através de massagem abdominal no sentido encéfalo-caudal. As alíquotas de sêmen foram coletadas com seringa de 1 mL e diluídas imediatamente em Beltsville Thawing Solution (BTS®) na proporção 1:1 (Yasui *et al.*, 2015; Spica *et al.*, 2021). Em seguida, as amostras obtidas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL para avaliações laboratoriais. A diluição no extensor BTS® foi realizada com o intuito de aumentar o baixo volume seminal obtido na coleta de amostras da espécie, bem como, reduzir os efeitos de possíveis contaminações com resíduos de urina ou sangue, os quais poderiam ativar a motilidade prematuramente e dessa maneira inviabilizar a utilização das amostras (Spica *et al.*, 2021).

Em seguida, 1 µL de sêmen de cada amostra foi colocado em câmara hematimétrica de Neubauer em microscópio óptico em uma objetiva de 40X para verificação de ativação prévia dos gametas. As amostras com a presença de espermatozoides móveis foram descartadas. Os microtubos com amostras viáveis foram mantidos refrigerados em caixas de poliestireno a  $14 \pm 1$ °C a fim de preservar parâmetros seminais da espécie por aproximadamente 5 minutos quando foi iniciado o processo de congelamento (Galo *et al.*, 2014).

## 2.3. Desenho experimental

Um total de 23 machos de *L. marmoratus* com o peso médio de  $2,71 \pm 0,96$  kg e identificados com microchip (AnimallTAG®) foram utilizados em quatro

experimentos para definir o melhor protocolo de criopreservação de sêmen para *L. marmoratus*.

Desse modo: *Experimento 1*, identificou-se os crioprotetores permeáveis com melhor desempenho assim como o melhor protocolo de descongelamento da amostra; *Experimento 2*, se ocorreu diferença em manter as amostras por duas ou 24 horas em vapor de nitrogênio; *Experimentos 3*, diferentes concentrações dos melhores crioprotetores permeáveis identificados no *Experimento 1* foram testados contra o protocolo sugerido por Gheller *et al.* (2019); *Experimento 4*, as duas melhores combinações (crioprotetor e concentração) no *Experimento 3* foram associados a crioprotetores não permeáveis e ainda comparados contra o protocolo sugerido por Gheller *et al.* (2019).

#### **2.4. Experimento 1 e 2**

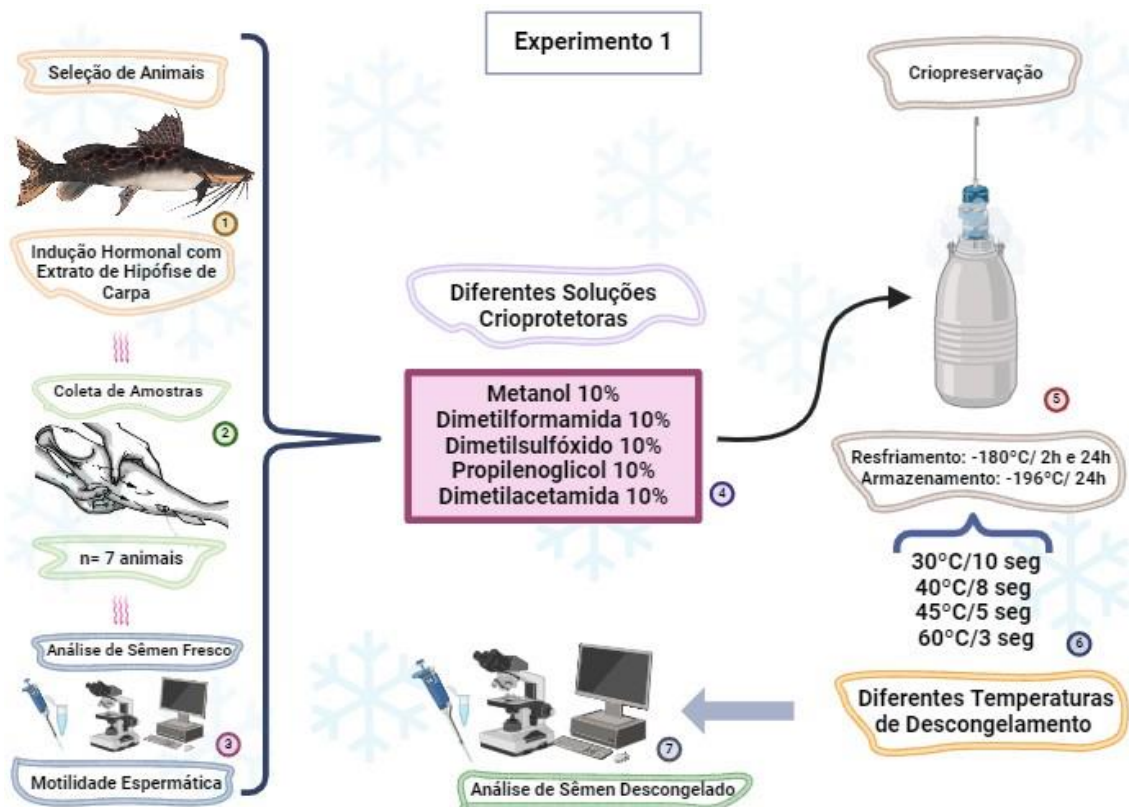
Sêmen de sete animais com taxas de motilidade iguais ou superiores a 80% foram submetidos à cinco crioprotetores permeável: Metanol (Sigma Aldrich®), Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich®), Dimetilformamida (Sigma Aldrich®), Dimetilacetamida (Sigma Aldrich®) e Propilenoglicol (Sigma Aldrich®). As amostras selecionadas individualmente, foram diluídas na solução crioprotetora na proporção de 1:4 (sêmen:meio crioprotetor). O meio crioprotetor foi composto pelo extensor (BTS®) + crioprotetor permeável fixado na concentração de 10% (ajustado para o volume final).

Após a diluição, as amostras foram imediatamente envasadas em palhetas de 0,25 mL (Minitube, Tiefenbach/Landshut, Alemanha). Em seguida, estas palhetas foram armazenadas em botijão de vapor de nitrogênio (Dry-Shipper MVE SC4/2 V, Genex, Toronto, Canada) por um período de 24 horas (Gheller *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2020). Afim de observar se o menor tempo de estocagem no Dry Shipper altera a qualidade das amostras, parte das amostras após 2 horas de armazenamento, foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (MVE Millennium 2000, Genex, Toronto, Canadá). O restante das amostras, após 24 horas, foram transferidas para o mesmo botijão de nitrogênio líquido, previamente reportado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram por mais 24 horas até seu descongelamento.

Foram congeladas um total de cinco palhetas por tratamento para cada animal, totalizando 175 palhetas criopreservadas foram analisadas. Para o descongelamento,

as amostras que permaneceram 24 horas no vapor de nitrogênio foram descongeladas por imersão em banho-maria. Foram testadas as seguintes combinações de tempos/temperaturas: 30°C/10s, 40°C/8s, 45°C/5s e 60°C/3s. Após o descongelamento, foram realizadas análises cinéticas dos espermatozoides em cada amostra, para determinar quais os melhores crioprotetores e a melhor temperatura para realizar o descongelamento das amostras.

Para o segundo experimento, as amostras que tiveram melhor desempenho cinético no primeiro teste e estocadas por 2 horas no vapor de nitrogênio líquido, foram descongeladas para serem analisadas. Os tratamentos contendo Metanol, DMF e DMA foram selecionados para esse teste, após passarem por análises estatísticas no *Experimento 1*. As amostras foram descongeladas a uma temperatura de 45°C/5s, em seguida o efeito do tempo de armazenamento sobre desempenho cinético.



**Figura 1.** Experimento 1 - Teste de diferentes soluções crioprotetoras e diferentes temperaturas de descongelamento em sêmen criopreservado de *Leiarius marmoratus*.

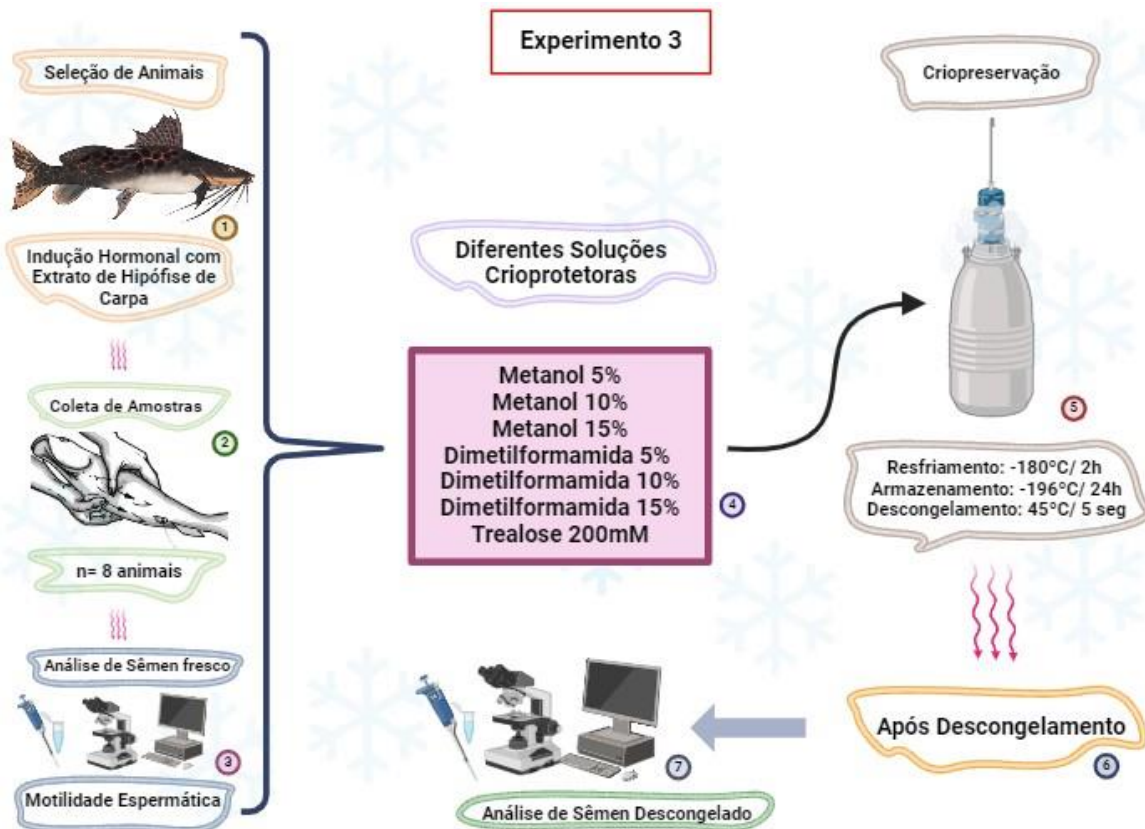
## 2.5. Experimento 3

No terceiro experimento os dois melhores crioprotetores permeáveis

identificados no *Experimento 1* (Metanol e DMF) foram confrontados com o protocolo sugerido no estudo de Gheller *et al.* (2019) (Figura 2). Para este experimento um delineamento completamente ao acaso foi realizado, testando-se sêmen de 8 animais em sete tratamentos: Metanol (5, 10 e 15%); Dimetilformamida (5,10 e 15%) além do controle Trealose (200mM).

As amostras selecionadas individualmente, foram diluídas na solução crioprotetora na proporção de 1:4 (sêmen:meio crioprotetor) e o controle apenas Trealose (200mM). Para os tratamentos o meio crioprotetor foi composto pelo extensor (BTS®) + crioprotetor permeável fixado na concentração de acordo com cada tratamento (5, 10 e 15%). Após a diluição, as amostras foram imediatamente envasadas em palhetas de 0,25 mL (Minitube, Tiefenbach/Landshut, Alemanha). De acordo com o *Experimento 2*, as amostras foram mantidas por duas horas em botijão de vapor de nitrogênio (Dry-Shipper MVE SC4/2 V, Genex, Toronto, Canada) e posteriormente as palhetas foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido (MVE Millennium 2000, Genex, Toronto, Canadá) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram por mais 24 horas até seu descongelamento.

Para análise da cinética, cinco palhetas foram congeladas por tratamento para cada animal, totalizando 280 palhetas criopreservadas. As amostras foram descongeladas por imersão em banho-maria na temperatura de  $45^{\circ}\text{C}/5\text{s}$  e seguiram para a análise da cinética dos espermatozoides (Figura 2).



**Figura 2.** Experimento 3 – Sêmen de *Leiarus marmoratus* submetido em diferentes crioprotetores permeáveis com diferentes concentrações.

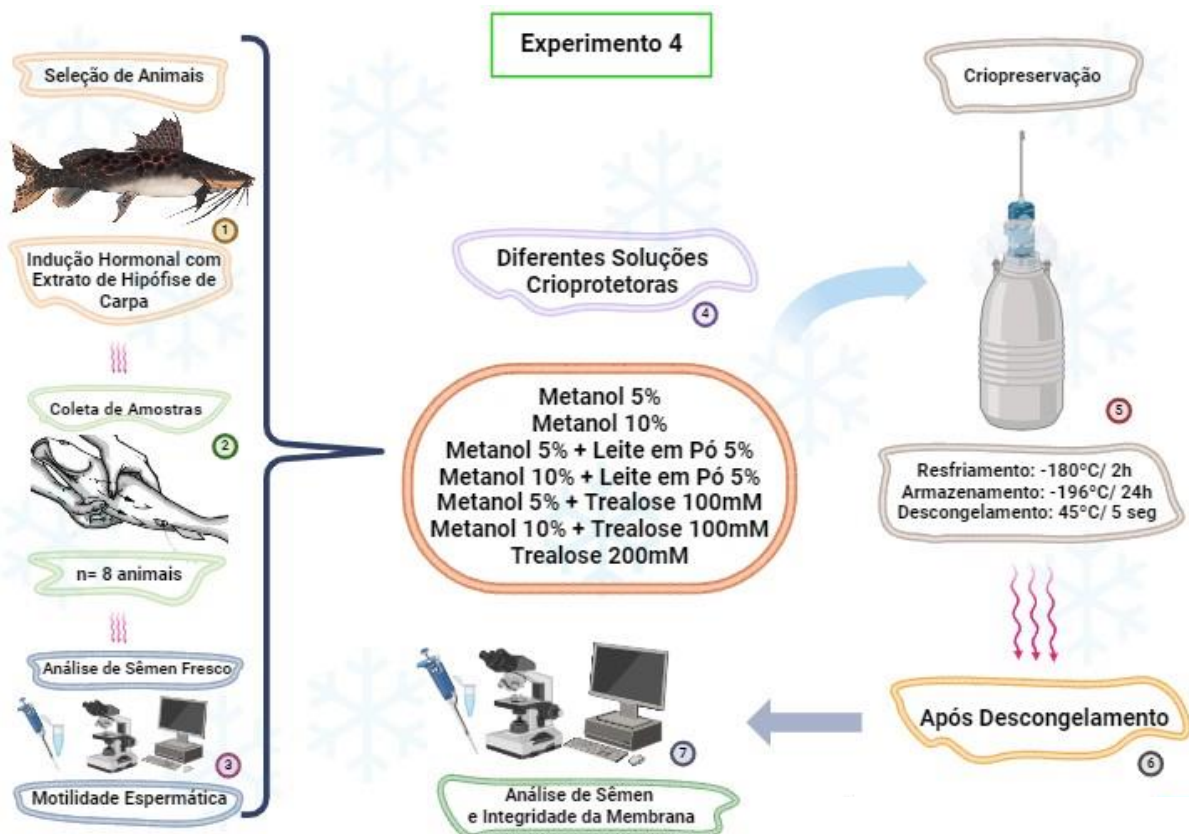
## 2.6. Experimento 4

Amostras de sêmen de oito animais foram selecionadas, e testadas quanto a combinação do melhor crioprotetor permeável em diferentes concentrações combinados a crioprotetores impermeáveis. Os tratamentos foram testados foram diluídos na solução crioprotetora na proporção de 1:4 (sêmen+meio crioprotetor) além do controle Trealose (200mM). Para os tratamentos o meio crioprotetor foi composto pelo extensor (BTS®) + crioprotetor permeável (duas concentrações) ou associado ainda a um crioprotetor impermeável. Após a diluição, a solução foi imediatamente adicionada as palhetas de 0,25 mL (Minitube, Tiefenbach/Landshut, Alemanha).

O crioprotetor permeável, nesse caso metanol, foi testado em duas concentrações (5 e 10%) isolado e combinado com leite em pó (Molico Skimmed®, Nestlé, São Paulo, Brazil) a 5% e trealose (Sigma Aldrich®) a 100 mM. Após o envase, as amostras permaneceram por duas horas no vapor de nitrogênio no botijão de vapor de nitrogênio (Dry-Shipper MVE SC4/2 V, Genex, Toronto, Canada). Após o resfriamento por duas horas as palhetas foram transferidas para botijão de nitrogênio

líquido (MVE Millennium 2000, Genex, Toronto, Canadá) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram por mais 24 horas até seu descongelamento.

Foram congeladas cinco palhetas por tratamento para cada animal, totalizando 280 palhetas criopreservadas. As amostras foram descongeladas por imersão em banho-maria a uma temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C}/5$  segundos para posteriores avaliações da cinética dos espermatozoides e de viabilidade celular (Figura 3).



**Figura 3.** Experimento 4 - Sêmen de *Leirius marmoratus* testado apenas com crioprotetores permeáveis ou combinado com crioprotetores impermeáveis.

## 2.7. Análises de amostras após descongelamento

### 2.7.1. Parâmetros cinéticos (CASA)

Para avaliação dos parâmetros cinéticos utilizou-se o plugin Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) do software livre ImageJ. Uma alíquota de  $1\text{ }\mu\text{L}$  de sêmen descongelado foi adicionada a microtubo de  $1,5\text{ mL}$  e ativada com  $50\text{ }\mu\text{L}$  de água destilada. Após ativação,  $5\text{ }\mu\text{L}$  (sêmen + água destilada) da amostra em microtubo foram depositados em câmara hematimétrica de Neubauer (Olen, Kasvi, São José dos



Pinhais, Brazil), com 0,1 mm de profundidade, cobertos com lamínula de vidro (24 x 24 mm) e em seguida levada a um microscópio óptico (Bel Solaris, Milan, Italy) com ampliação de 100 x, conectada a uma câmera de vídeo digital (Basler AC640–120uc, 658 x 492 pixels, 120 fps, Ahrensburg, Alemanha) configurada para a captura de imagens a 100 frames por segundos. Foram gravados vídeos de 30 segundos registrando a movimentação espermática, sincronicamente à ativação com água destilada.

A captura da imagem foi iniciada após a ativação, a uma taxa de 100 quadros por segundo (fps). Utilizando o programa Pylon Viewer (versão 4.1.0.3660 64 bits; Basler, Ahrensburg, Alemanha), foram selecionados trechos de 0,5 segundos de vídeo (100 frames) 10 segundos após ativação para análise e três réplicas (campos de amostras) foram feitas por animal em cada tratamento. Os vídeos foram processados no software VirtualDub 1.10.4 (Version 1.10.04; Microsoft Virtual Studio, Redmond, USA) de acordo com descrições de Wilson-Leedy e Ingermann (2007).

Posteriormente, os trechos selecionados foram salvos como sequências de imagens em diretório específico e posteriormente importadas pelo software ImageJ (Version 1.53e 64-Bit, National Institutes of Health, USA) e processadas a partir do plugin CASA, utilizando-se as configurações adaptadas para peixes neotropicais brasileiros. Para os experimentos 1 a 3, os seguintes valores de variáveis de entrada foram usados no plugin CASA: a=1 ; b=40 ; c=50 ; d=8 ; e=3 ; f=10 ; g=15 ; h=5 ; i =1 ; j =25 ; k =25 ; l=35 ; m=80 ; n =80 ; o=50 ; p =60 ; q=100 ; r =431.03 ; s =0 ; e t =0. Para o experimento 4, foram utilizados os valores a=4 ; b=120 ; c=50 ; d=8 ; e=3 ; f=10 ; g=15 ; h=5 ; i =1 ; j =25 ; k =25 ; l=35 ; m=80 ; n =80 ; o=50 ; p =60 ; q=100 ; r =431.03 ; s =0 ; e t =0.

Através do plugin CASA foi possível avaliar taxa de motilidade espermática (MOT %), velocidade curvilínea (VCL  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), velocidade média de deslocamento (VAP  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), velocidade em linha reta (VSL  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), retilinearidade (STR %), oscilação (WOB %), progressão (PROG  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento cruzado (BCF Hz) e número de espermatozoides (SPTZs).

### **2.7.2. Integridade da membrana**

Para avaliar a integridade da membrana espermática, foi utilizado o kit de dupla coloração LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). O

kit é composto pelos corantes fluorescentes SYBR-14 (para coloração de ácido nucleico de células vivas) e iodeto de propídio (PI, para coloração de ácido nucleico de células mortas que penetra através da membrana plasmática danificada), adaptado do método proposto por Hagedorn *et al.* (2009).

Uma alíquota de sêmen de 50  $\mu$ L foi misturado com 0,25  $\mu$ L de SYBR-14 (0,02 mM) e incubado na ausência de luz e temperatura ambiente de 25 °C por 4 min. Em seguida, 1,0  $\mu$ L de PI (1,19 mM) foi adicionado à amostra e incubada por 1 min nas mesmas condições. Desta incubação, os espermatozoides foram utilizados para preparar lâminas histológicas e analisados em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) em objetiva de 400X, microscópio de epifluorescência Axioplan-Zeiss).

Foram avaliadas três lâminas por animal de cada tratamento, totalizando 200 espermatozoides por lâmina. Após a determinação do número de espermatozoides com membranas íntegras e com membranas rompidas, foi calculada a taxa de integridade da membrana.

## 2.8. Análise estatística

Quanto ao tratamento estatístico, os dados foram submetidos a análise de normalidade (teste de Shapiro Wilk ou Kolmogorov-Smirnov) e de homogeneidade (teste de Bartlett ou Levene). Além disso, foi analisado a presença de outliers e quando presente, foram retirados.

Para o experimento 1 (n=7) e 2 (n=3), os dados foram analisados por meio de análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), seguido de teste de Tukey quando observado efeito significativo de um dos fatores. Esses dados estão apresentados em gráficos de barra (média e desvio padrão). Para o experimento 1, a ANOVA de duas vias considerou os efeitos dos crioprotetores permeáveis, da temperatura de descongelamento e da interação entre os fatores. Para o experimento 2, a ANOVA de duas vias considerou os efeitos dos crioprotetores permeáveis, do tempo de permanência das amostras no Dry-Shipper antes da transferência das amostras para o botijão de nitrogênio líquido e a interação entre os fatores.

Para os experimentos 3 (n=8) e 4 (n=8), as variáveis que atenderam aos pressupostos estatísticos foram submetidas a análise da variância de uma via (One-Way ANOVA), seguido de teste de Tukey quando observado diferença significativa.

Esses dados estão apresentados em gráficos de barra (média e desvio padrão).

As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Esses dados estão apresentados em gráficos Box e Whiskers (Mediana, máximo e mínimo). Todas as análises foram realizadas considerando uma significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os testes estatísticos foram realizados por meio do software GraphPad Prism 9.0.

### 3. Resultados

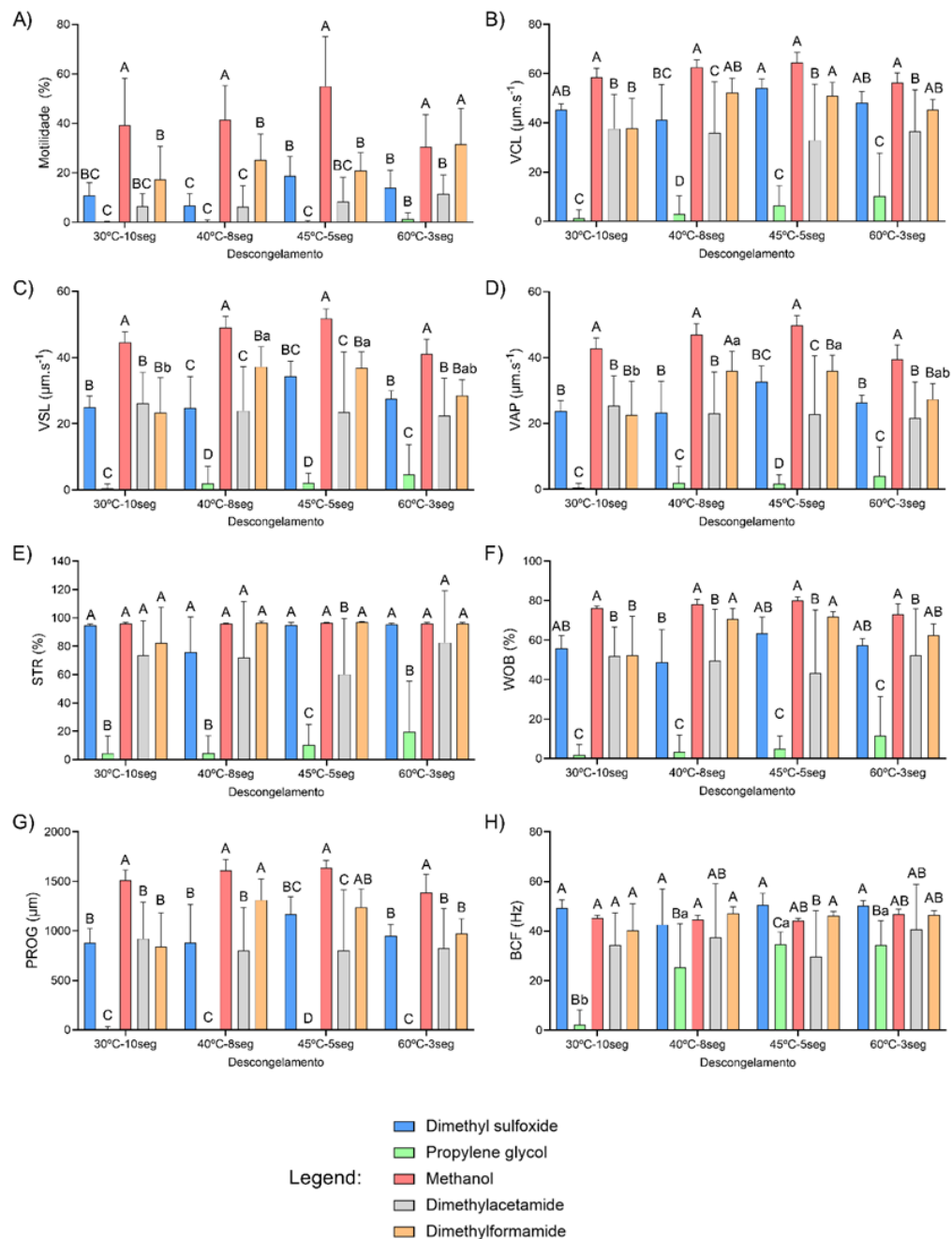
#### 3.1. Experimento 1

Os resultados da análise de cinética espermática são apresentados na Figura 4. Para a motilidade espermática (Figura 4A), houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos crioprotetores permeáveis e da interação entre os fatores, porém, não houve efeito do protocolo de descongelamento. A motilidade espermática das amostras criopreservadas em metanol foi superior à dos outros crioprotetores independente do protocolo de descongelamento. A exceção foram as amostras descongeladas a  $60^{\circ}\text{C}/3\text{s}$ , que não diferiu das amostras criopreservadas com DMF. Além disso, pode-se destacar que o propilenoglicol apresentou as piores taxas (próximo de 0%), e que o DMSO e o DMF conseguiram ser mais eficientes de forma geral ao DMA e ao propilenoglicol.

Houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos crioprotetores permeáveis para as variáveis VCL ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ), STR, WOB e Progressividade, porém não diferiram quanto ao protocolo de descongelamento e da interação dos fatores (Figuras 4B, 4E, 4F e 4G). Os espermatozoides criopreservados em metanol, sempre apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) de VCL, WOB e Progressividade em relação ao observado em propilenoglicol e DMA, independente do protocolo de descongelamento. Quanto ao STR os resultados foram iguais ( $p > 0,05$ ) entre metanol, DMSO, DMF e DMA (com exceção no descongelamento com  $45^{\circ}\text{C}/5\text{s}$ ), sendo superiores ( $p < 0,05$ ) aos resultados obtidos com as amostras criopreservadas com propilenoglicol.

As variáveis VSL, VAP e BCF (Figura 4C, 4D e 4H) apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) do crioprotetor permeável e no protocolo de descongelamento das amostras, mas não houve ( $p > 0,05$ ) interação significativa dos fatores. Quando consideramos os efeitos dos crioprotetores permeáveis, VSL e VAP dos

espermatozoides criopreservados em metanol se destacou positivamente, porém não foi possível observar este desempenho no BCF. Por outro lado, os espermatozoides criopreservados com propilenoglicol sempre apresentaram o pior desempenho ( $p < 0,05$ ) para estas variáveis cinéticas, com exceção dos tratamentos 40°C/8s e 60°C/3s para o BCF. Com relação ao protocolo de descongelamento, o comportamento foi semelhante entre as variáveis VSL, VAP e BCF diferindo o crioprotetor utilizado. Logo, tanto o VSL e o VAP dos espermatozoides que foram criopreservados em DMF quanto a variável BCF dos espermatozoides criopreservados em propilenoglicol um tempo maior em uma temperatura mais baixa (30°C/10s) foi pior ( $p < 0,05$ ) do que descongelados em 40°C/8s ou 45°C/5s.



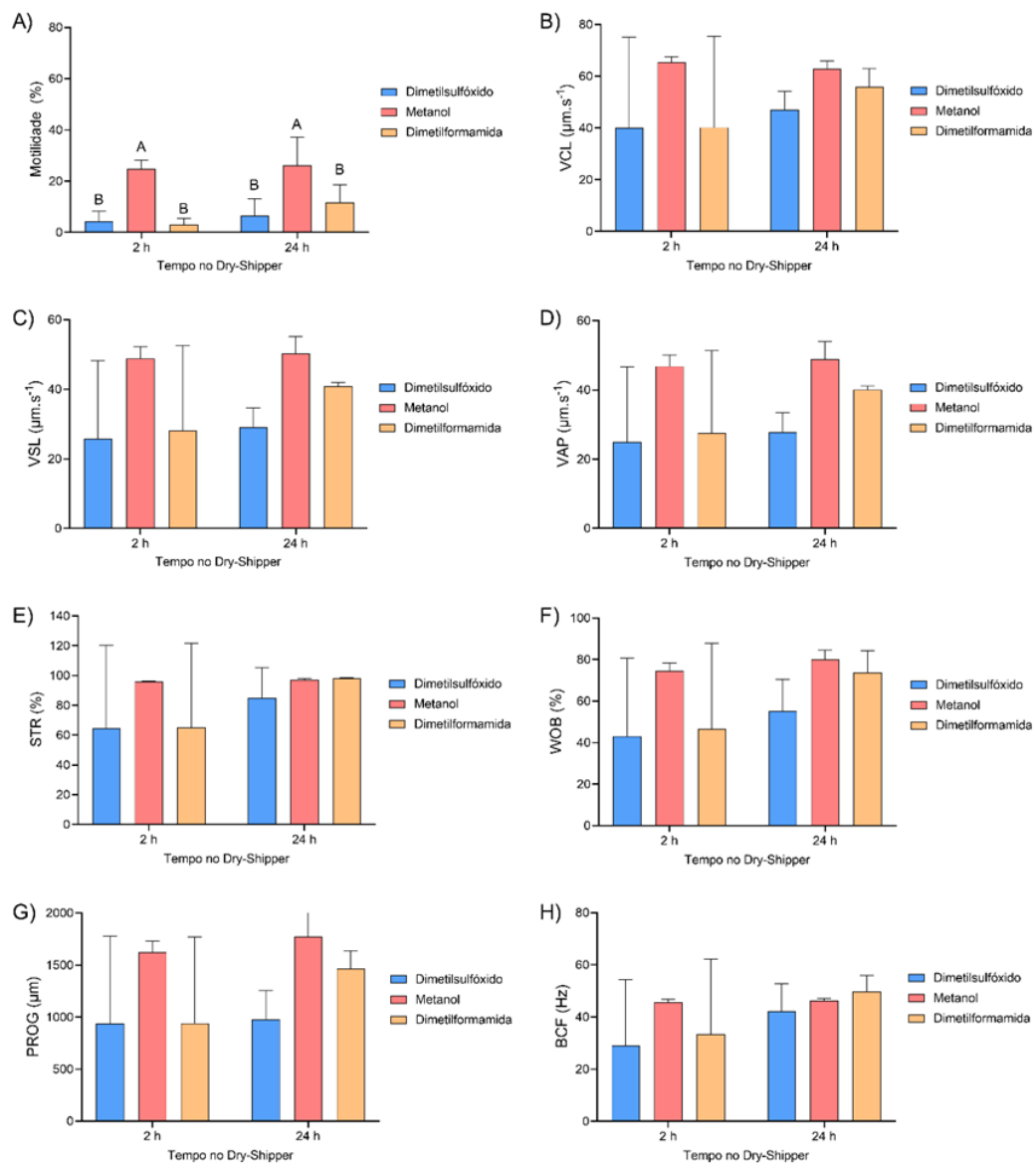
**Figura 4.** Efeito de diferentes temperaturas de descongelamento e diferentes crioprotetores permeáveis na cinética espermática. A) Motilidade (%) -(Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 68,36$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 2,198$ ;  $p = 0,0918$ . Interação:  $F(12, 120) = 2,330$ ;  $p = 0,0102$ ). B) VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 101,1$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 1,581$ ;  $p = 0,1976$ . Interação:  $F(12, 120) = 1,157$ ;  $p = 0,3219$ ). C) VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 117,5$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 3,897$ ;  $p = 0,0107$ . Interação:  $F(12, 120) = 1,704$ ;  $p = 0,0740$ ). D) VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 115,7$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 3,872$ ;  $p = 0,0110$ . Interação:  $F(12, 120) = 1,699$ ;  $p = 0,0750$ ). E) STR (%) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 90,96$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 1,348$ ;  $p = 0,2623$ . Interação:  $F(12, 120) = 0,8543$ ;  $p = 0,5949$ ). F) WOB (%) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 106,9$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 0,8321$ ;  $p = 0,4788$ . Interação:  $F(12, 120) = 1,253$ ;  $p = 0,2557$ ). G) PROG ( $\mu\text{m}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 129,9$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 3,501$ ;  $p = 0,0627$ . Interação:  $F(12, 120) = 1,542$ ;  $p = 0,1184$ ). H) BCF (Hz) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(4, 120) = 25,06$ ;  $p < 0,0001$ . Efeito do descongelamento:  $F(3, 120) = 5,123$ ;  $p = 0,0023$ . Interação:  $F(12, 120) = 3,250$ ;  $p = 0,0004$ ). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os crioprotetores, dentro do mesmo método de descongelamento, utilizando o teste de

Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre forma de descongelamento, dentro do mesmo crioprotetor, pelo teste de Tukey. n = 7.

### **3.2. Experimento 2**

Os resultados da análise de motilidade e cinética espermática estão sumarizados na Figura 5. Como o objetivo deste experimento foi identificar se havia alteração qualitativa nas amostras, quanto ao tempo de permanência no Dry-Shipper, antes transferência para o nitrogênio líquido, selecionou-se os melhores tratamentos obtidos no Experimento 1. Logo foram selecionados os crioprotetores permeáveis metanol, DMSO e DMF, todos na concentração de 10%.

Para a motilidade espermática (Figura 5A), houve efeito significativo apenas dos crioprotetores permeáveis e não houve efeito do tempo de permanência no Dry-Shipper e da interação entre os fatores. Em ambos os tempos de permanência das amostras no Dry-Shipper (2 ou 24 horas), a maior motilidade dos espermatozoides foi observada nas amostras criopreservadas com Metanol (10%), que diferiu significativamente dos demais crioprotetores.



**Figura 5.** Efeito de diferentes tempos de armazenamento em vapor de nitrogênio na cinética espermática. A) Motilidade (%) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 18,61$ ;  $p=0,0002$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 1,875$ ;  $p=0,1960$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,5944$ ;  $p=0,5674$ ). B) VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 1,637$ ;  $p=0,2351$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 0,4642$ ;  $p=0,5086$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,2957$ ;  $p=0,7493$ ). C) VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 3,955$ ;  $p=0,0579$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 0,7955$ ;  $p=0,3900$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,2812$ ;  $p=0,7597$ ). D) VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 3,903$ ;  $p=0,0595$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 0,8316$ ;  $p=0,3798$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,2763$ ;  $p=0,7633$ ). E) STR (%) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 0,6744$ ;  $p=0,5277$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 1,335$ ;  $p=0,2703$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,3406$ ;  $p=0,7180$ ). F) WOB (%) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 2,059$ ;  $p=0,1703$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 1,722$ ;  $p=0,2140$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,3046$ ;  $p=0,7429$ ). G) PROG ( $\mu\text{m}$ ) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 3,238$ ;  $p=0,0751$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 0,9790$ ;  $p=0,3420$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,9790$ ;  $p=0,3420$ ). H) BCF (Hz) - (Efeito do Crioprotetor:  $F(2, 12) = 0,5843$ ;  $p=0,5726$ . Efeito do tempo no Dry-shipper:  $F(1, 12) = 1,694$ ;  $p=0,2175$ . Interação:  $F(2, 12) = 0,3779$ ;  $p=0,6932$ ). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os crioprotetores, dentro do mesmo método de descongelamento, utilizando o teste de Tukey.  $n = 3$ .

Nas demais variáveis de cinética espermática não houve efeito significativo de

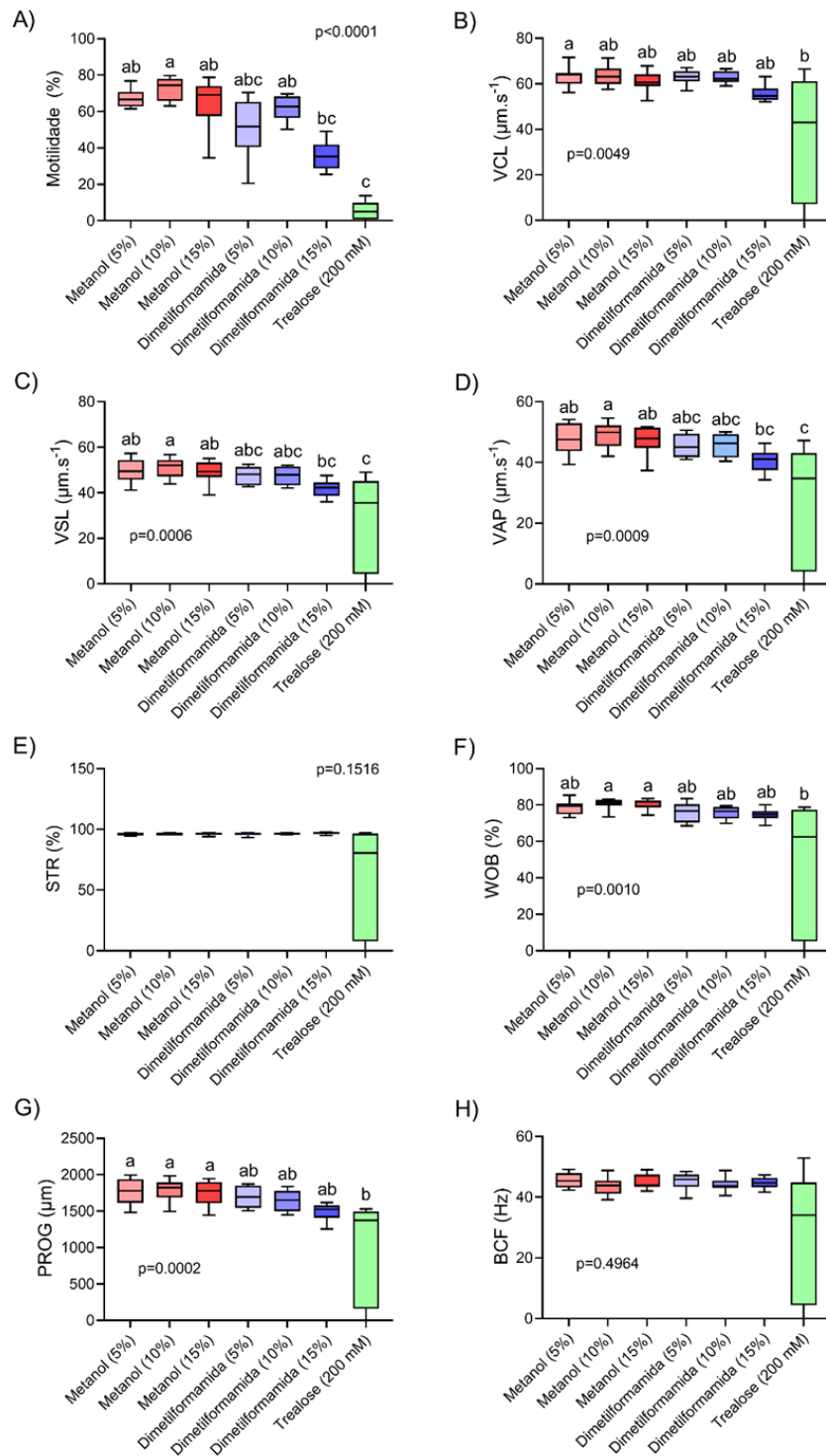
nenhum dos fatores, demonstrando que a permanência das amostras por um tempo reduzido no vapor de nitrogênio dentro do Dry-Shipper, não prejudica a qualidade do processo de criopreservação.

### 3.3. Experimento 3

Os resultados da análise da cinética espermática estão sumarizados na Figura 6. Após o descongelamento dos espermatozoides submetidos em diferentes tratamentos com crioprotetores permeáveis, o comportamento da motilidade espermática (6a), VSL (Figura 6C) e VAP (Figura 6D) foi semelhante ( $P > 0,05$ ). As amostras criopreservadas com Metanol (10%) apresentaram resultados superior ( $P < 0,05$ ) em relação as amostras seminais criopreservadas com DMF (15%) e trealose (200mM).

O desempenho aquém das amostras criopreservadas em trealose (200mM) em relação ao metanol foi também observada nas variáveis VCL (Figura 6B), WOB (Figura 6F) e PROG (Figura 6G), entretanto com resposta diferente entre os tratamentos. Resultados superiores ( $p < 0,05$ ) de VCL foram observados apenas nos espermatozoides que foram submetidos em metanol (5%), enquanto as concentrações de 10 e 15% o WOB foi superior ( $p < 0,05$ ) ao protocolo com trealose (200mM). Por outro lado, em qualquer concentração testada de metanol, a variável PROG foi maior ( $p < 0,05$ ) do que os espermatozoides submetidos em trealose (200mM). Para as demais variáveis cinéticas analisadas, STR (Figura 6E) ( $p > 0,05$ ) e BCF (Figura 6H) ( $p > 0,05$ ), não foi observado diferença entre os grupos experimentais.

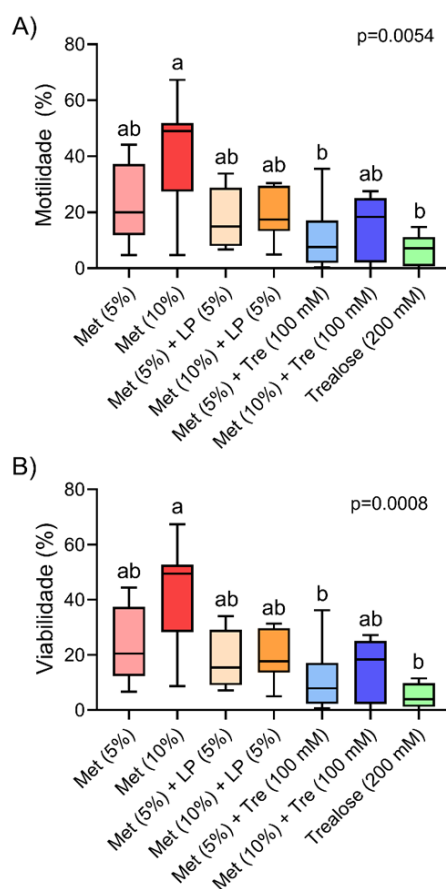




**Figura 6.** Efeito de diferentes concentrações de crioprotetores permeáveis na cinética espermática. A) Motilidade (%) ( $p < 0,0001$ ); B) VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p = 0,0049$ ); C) VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p = 0,0006$ ); D) VAP ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p = 0,0009$ ); E) FOR (%) ( $p = 0,1516$ ); F) WOB (%) ( $p = 0,0010$ ); G) PROG ( $\mu\text{m}$ ) ( $p = 0,0002$ ); H) BCF (Hz) ( $p = 0,4964$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos experimentais, utilizando o teste de Dunn.  $n = 8$ .

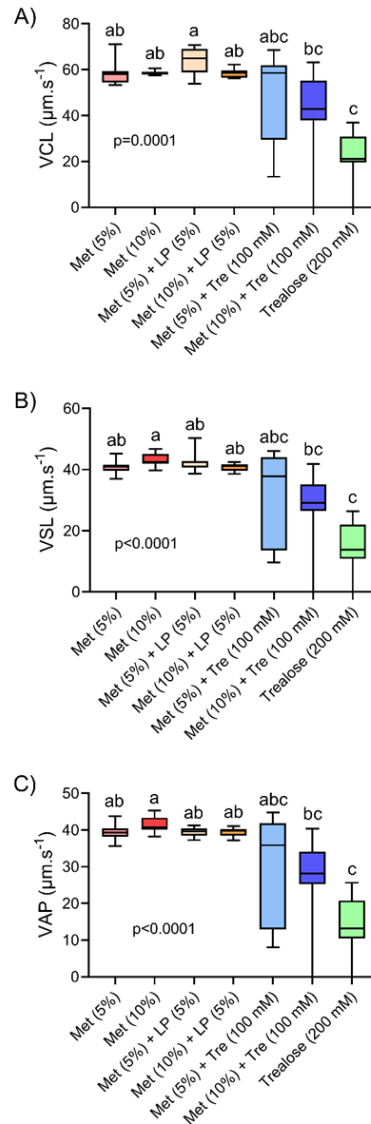
### 3.4. Experimento 4

Na Figura 7, pode ser observada que a motilidade (Figura 7A) ( $p < 0,05$ ) e a viabilidade celular (Figura 7B) ( $p < 0,05$ ), diferiram significativamente entre os grupos experimentais. Para ambas variáveis o maior valor foi observado no grupo de amostras criopreservadas com metanol (10%), diferindo significativamente das amostras criopreservadas com a combinação de metanol (5%) e trealose (100mM), e das amostras criopreservadas apenas com trealose (200mM).



**Figura 7.** Análise da motilidade e viabilidade celular após criopreservação com diferentes soluções crioprotetoras. A) Motilidade (%) ( $p=0,0054$ ); B) Viabilidade (%) ( $p=0,0008$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos experimentais, utilizando o teste de Dunn.  $n = 8$ . Met (Metanol); LP (Leite em Pó).

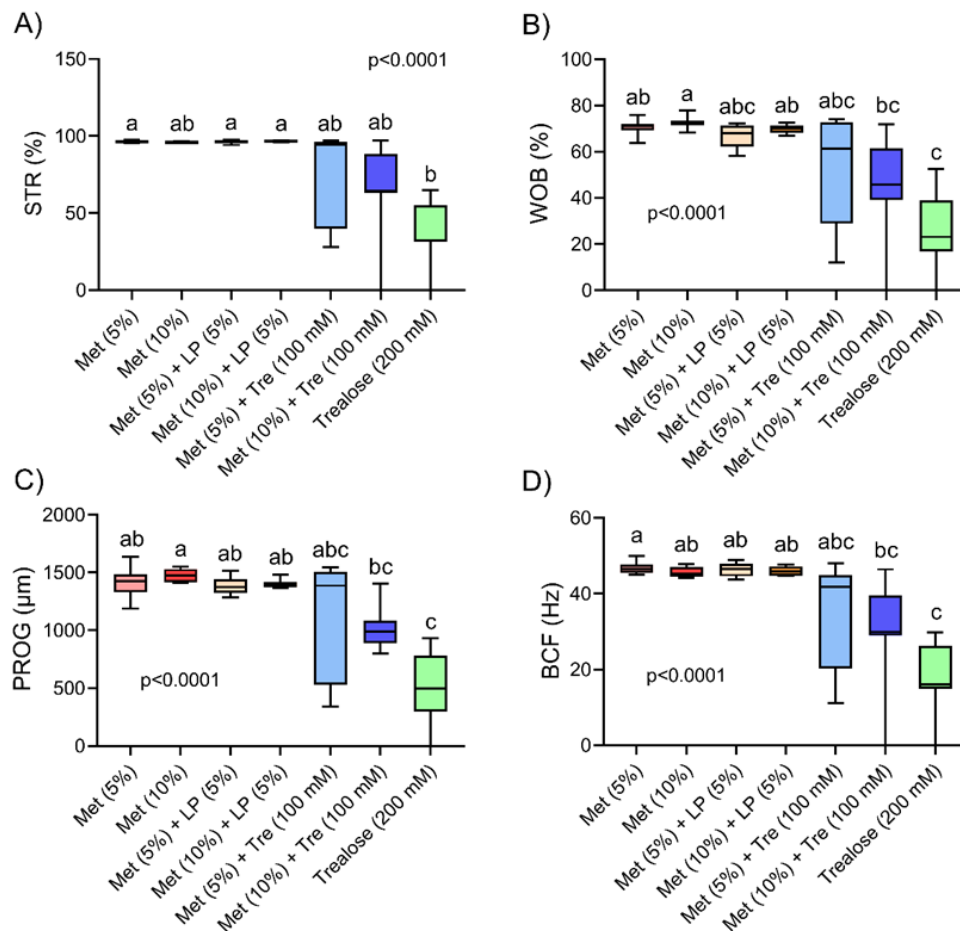
Quanto ao VCL (Figura 8A) foi maior no grupo contendo metanol (5%) + leite em pó (5%), ao tratamento combinando metanol (10%) e trealose (100mM), e das amostras do tratamento apenas com trealose (200mM). O VSL (Figura 8B) e VAP (Figura 8C) apresentaram o mesmo comportamento, maior valor observado no grupo apenas com metanol (10%), em relação aos grupos que combinaram metanol (10%) e trealose (100mM), e das amostras criopreservadas apenas com trealose (200mM).



**Figura 8.** Cinética espermática após criopreservação com diferentes soluções crioprotetoras. A) VCL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p=0,0001$ ); B) VSL ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p<0,0001$ ); C) PAV ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p<0,0001$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos experimentais, utilizando o teste de Dunn.  $n = 8$ . Met (Metanol); LP (Leite em Pó).

O STR (Figura 9A) foi maior ( $p<0,05$ ) nos grupos contendo metanol (5%), e metanol (5% ou 10%) + leite em pó (5%), em relação as amostras criopreservadas apenas com trealose (200mM). As variáveis WOB (Figura 9B) e PROG (Figura 9C) apresentaram o mesmo comportamento. Neste caso, os espermatozoides no grupo com apenas o metanol (10%) na solução, diferiram ( $p<0,05$ ) dos grupos que combinaram metanol (10%) e trealose (100mM), e das amostras criopreservadas apenas com trealose (200mM). Nas amostras criopreservadas com apenas 5% de metanol o BCF (Figura 9D), foi maior ( $p<0,05$ ) do que amostras criopreservadas com a combinação de metanol (10%) e trealose (100mM), e das amostras criopreservadas

apenas com trealose (200mM).



**Figura 9.** Cinética espermática após criopreservação com combinações de diferentes soluções crioprotetoras. A) STR (%) ( $p < 0,0001$ ); B) WOB (%) ( $p < 0,0001$ ); C) PROG ( $\mu\text{m}$ ) ( $p < 0,0001$ ); D) BCF (Hz) ( $p < 0,0001$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos experimentais, utilizando o teste de Dunn.  $n = 8$ . Met (Metanol); LP (Leite em Pó).

#### 4. Discussão

De acordo com a FAO (2019) a aquicultura é uma cadeia produtiva-industrial predominantemente nova que ainda depende de espécies selvagens e com poucas e relativamente novas instalações *ex situ* para a conservação de recursos genéticos das espécies produzidas. Na aquicultura brasileira, a produção de juvenis do catfish híbrido “pintado da amazonia”, depende da disponibilidade do sêmen do *L. marmoratus* durante o período reprodutivo da espécie. E por razões como: pouco volume de semen produzido pelo *L. marmoratus*; assincronia reprodutiva com as fêmeas de espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e a dificuldade legal para obtenção de reprodutores na natureza, justificam o uso de sêmen criopreservado. Neste estudo,

um protocolo completo para criopreservar sêmen de *L. marmoratus* foi desenvolvido a partir de uma sequência de experimentos, a fim de tornar viável o uso no setor produtivo e ainda conservar recursos genéticos da espécie alvo.

A revisão histórica sobre a avaliação da motilidade espermática como ferramenta para de pesquisa na aquicultura produzida por Gallego e Asturiano (2018) os autores foram categóricos em afirmar que a avaliação seminal é uma ferramenta potente para Aquicultura e fins ecológicos. Historicamente a motilidade espermática vem sendo considerada o principal biomarcador de qualidade espermática para os peixes (Mylonas *et al.*, 2017; Boryshpolets *et al.*, 2013; Suquet *et al.*, 2010; Billard e Cosson, 1992). O resultado da motilidade espermática obtido no primeiro experimento ( $54,99 \pm 20,05\%$ ), revelou a superioridade do metanol frente aos demais crioprotetores permeáveis testados. A consistência dos resultados do metanol também foi notada no segundo e terceiro experimento além do desempenho superior frente ao protocolo proposto por Gheller *et al.* (2019) na literatura para criopreservar sêmen de *L. marmoratus*.

O uso do BTS® como extensor pode favorecer a ambiência dos espermatozoides do *L. marmoratus*. No trabalho de Borges *et al.* (2020) que não foi empregado este extensor, os autores conseguiram motilidade espermática inferior a 10% contrastando com o observado na mesma concentração de metanol no presente estudo. O BTS® que originalmente é um extensor desenvolvido para suínos, adapta-se muito bem para o sêmen de peixes. Inúmeras espécies sulamericanas o BTS já foi associado a 10% de metanol como para *Prochilodus lineatus* (Murgas *et al.*, 2007) *Piaractus mesopotomaiacus* (Streit Jr *et al.*, 2006) e *Rhamdia quelen* (Corso *et al.*, 2019). De acordo com o Murgas *et al.* (2007) o BTS® protocolo, já que, é um diluidor que possui em sua fórmula componentes que, além de nutrir células e proporcionarem um microambiente osmoticamente favorável, protege a membrana citoplasmática durante o congelamento. A fácil permeabilidade celular do crioprotetor metanol (Harvey e Carolsfeld, 1993) associado a qualidade supracitada do extensor BTS, resultaram em uma motilidade maior dos espermatozoides de *L. marmoratus* submetidos a este tratamento.

De um modo geral as demais variáveis avaliadas na cinética espermática devem ser compatíveis com os resultados encontrados para a motilidade. Desse modo, o desempenho do metanol para todos os índices cinéticos avaliados, quando testado diferentes protocolos de descongelação foram superiores ao propilenoglicol e

ao DMA, com algumas poucas exceções. Variáveis como VSL, VCL e VAP, são citadas como altamente correlacionadas com a fertilização foram destacadas quando utilizado o metanol. E fato, quanto maior a velocidade dos espermatozoides maior a chance de alcançar o óócito e realizar a fertilização (Viveiros *et al.*, 2010; Gallego *et al.*, 2013).

Os principais danos para o sêmen podem surgir em decorrência do descongelamento (Isachenko *et al.*, 2019). Achar a combinação ideal de temperatura para descongelação e o tempo que o espermatozoide pode ficar exposto, é a chave do processo. Logo, quanto mais lento o processo de descongelamento maior será o dano, uma vez que os cristais de gelo se fundem e formam cristais maiores, causando mais problemas as células (Benson, 2015). No experimento para verificar a ação de diferentes metodologias de descongelamento para as amostras de *L. marmoratus*, observou-se que, as diferentes metodologias não influenciaram tanto quanto a escolha do crioprotetor permeável sobre as variáveis cinéticas.

A metodologia de 45°C/5 seg impactou na motilidade, VSL, VAP e BCF, mostrando que uma taxa rápida de descongelamento pode trazer benefícios aos espermatozoides (Martínez e Pardo, 2013). Em outra pesquisa de criopreservação seminal para a espécie alvo, o descongelamento também foi realizado com a temperatura de 45°C/5 seg (Gheller *et al.*, 2019). Portanto, a taxa de descongelamento é crítica para preservar a viabilidade dos espermatozoides, tendo impacto sobre parâmetros como motilidade, por exemplo, o que pode ser crucial para uma posterior fertilização com esse material descongelado (Yavas e Bozkurt, 2011).

De acordo com os resultados do presente estudo, temperaturas entre 40 e 45°C por um curto período, foram ideias para recuperar a estabilidade da membrana ou o metabolismo dos espermatozoides. Sendo assim, no primeiro experimento foi possível notar que a ação como crioprotetor permeável do Metanol, seguido do DMF e DMSO podem ser utilizados para espécie e o protocolo de descongelamento a 45°C/5 seg com bons resultados e foram mantidos nos próximos testes da pesquisa.

Grande parte dos protocolos de criopreservação de sêmen utilizados para peixes neotropicais empregam a manutenção das amostras expostas no vapor de nitrogênio por períodos de até 18 ou 24 horas antes da imersão em nitrogênio líquido (Carolsfeldt *et al.*, 2003). Nesse sentido, é possível verificar que esses períodos de exposição ao vapor de nitrogênio limitam o processamento de amostras em larga escala, como por exemplo, atender mercado produtor de peixes (Krause *et al.*, 2021).

Os testes com melhores crioprotetores internos do primeiro experimento (Metanol, DMF e DMSO) submetidos em diferentes tempos (2 e 18 horas) de exposição ao vapor de nitrogênio não alterou as amostras. Esse resultado, corrobora com os encontrados por Krause *et al.* (2021), onde amostras de *Rhamdia quelen* submetidas durante 30 min de exposição no vapor de nitrogênio não apresentaram alterações significativas nos parâmetros cinéticos, sendo um tempo suficiente para uma boa curva de congelamento. É importante ressaltar que a melhor motilidade espermática, independentemente do tempo de exposição no vapor de nitrogênio, foi obtida com o sêmen criopreservado com o metanol.

Ainda que os resultados desta pesquisa sugeriram o uso de 2 horas de exposição das palhetas ao vapor de nitrogênio para a espécie, possivelmente este período pode ser reduzido, já que em menos de cinco minutos a temperatura interna dos cilindros pode chegar a  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Maria *et al.*, 2006). Já França *et al.* (2022), notou uma taxa de congelamento de aproximadamente  $-160\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , onde as amostras atinjam uma temperatura de  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  em 20 min. Assim, a manutenção das amostras de *L. marmoratus* por apenas 2 horas em vapor de nitrogênio já foi suficiente para realização da curva de congelamento eficiente para essa espécie, maximizando o processo de criopreservação de amostras.

É de conhecimento que a formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação seminal pode ser reduzida através do uso de fatores químicos como crioprotetores, que após o descongelamento podem diminuir a ação de crioinjúrias (Martínez e Pardo, 2013). Assim, durante o processo de criopreservação é importante estar atento em alguns pontos, como por exemplo, a concentração do crioprotetor na solução congelante (Hasanah *et al.*, 2020). Identificados os melhores crioprotetores internos no segundo experimento (Metanol e DMF), diferentes concentrações (5, 10 e 15%) foram testadas e com respostas significativas. Novamente o metanol (5 e 10%) de um modo geral apresentou bons resultados em relação ao tratamento controle usando trealose.

Com isso, os resultados obtidos nesse terceiro experimento mostram que a alta taxa de permeabilidade do metanol (Murgas *et al.*, 2007) pode vir a promover a proteção das células contra criolesões (Nascimento *et al.*, 2012). Em contrapartida, concentrações mais altas dos crioprotetores internos podem promover a desnaturação de proteínas e comprometer os resultados (Nascimento *et al.*, 2012). Logo, os resultados utilizando uma porcentagem maior de metanol (15%) foram descartados

do próximo para a realização do quarto experimento.

O tratamento com trealose a 200mM consideramos como controle, pois o mesmo foi proposto por Gheller *et al.* (2019) como protocolo para o *L. marmoratus*. No presente estudo ao confronta-lo com os tratamentos com Metanol e DMF, os resultados em sua maioria para a motilidade e cinética espermática não foram favoráveis. A motilidade espermática por exemplo com metanol (10%) durante o terceiro teste, foi de  $72,72 \pm 6,32\%$  enquanto com trealose (200mM) não superou em média  $5,7 \pm 4,93\%$ . No trabalho de Gheller *et al.* (2019) os autores registraram em média 26,3%.

Os crioprotetores impermeáveis basicamente são açúcares ou proteínas, que por serem moléculas de grande peso molecular, não conseguem penetrar no interior das células (Hovatta, 2005). Por possuírem características hidrofílica (ligam-se às moléculas de água), esses crioprotetores conseguem aumentar a viscosidade da solução e diminuir a ocorrência de crioinjúrias (Fahy, 2007). A partir deste contexto, o último experimento da pesquisa o objetivo foi combinar os crioprotetores permeáveis e impermeáveis para criopreservar o sêmen de *L. marmoratus*. Com isso observou-se variáveis que tiveram respostas significativas tanto para combinação entre crioprotetores como também para o uso individual do crioprotetor permeável.

No quarto experimento foi possível observar que o desempenho geral dos tratamentos usando trealose não foi traduzido em melhora, nem mesmo quando associado ao metanol. Tratamento contendo 200 mM de trealose, vale ressaltar que estudos observaram que concentrações de trealose superiores a 150 mM resultaram em efeitos negativos na criopreservação (Liu *et al.*, 2015; Varela Junior *et al.*, 2012) corroborando com os resultados da presente pesquisa.

Os resultados dos tratamentos contendo leite em pó como crioprotetor impermeável, foram tão eficientes quanto a utilização apenas metanol. O leite em pó é um crioprotetor conhecido pela sua atividade de estabilizar a membrana plasmática do esperma (Viveiros e Gondinho, 2009). Porém, de acordo com Morris *et al.* (2003) leite em pó, usado como crioprotetor externo, pode contribuir para uma baixa capacidade de fertilização do sêmen descongelado, ocasionado pela alteração osmótica do ambiente. É importante também salientar que o uso do leite em pó pode favorecer a presença de outro problema, a dificuldade da avaliação espermática, sendo é necessário ficar atento a proporção utilizada na solução crioprotetora (Neyrão, 2022).



A criopreservação vem sendo uma importante ferramenta para o desenvolvimento de programas de melhoramento animal na produção de peixes. Embora as análises de fertilização e taxa de eclosão não tenham sido realizadas nesta pesquisa, o estudo *in vitro* apresentou resultados significativos na manutenção de integridade celular e parâmetros de motilidade espermática.

## 5. Conclusão

Um protocolo de criopreservação seminal de *L. marmoratus* deve conter metanol, descongelado em 40°C/8 seg ou 45°C/5 seg e podendo ser resfriado por apenas 2 horas em dry-shipper antes de ser criopreservado em N<sub>2</sub>.

## Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Declaração de interesses

Os autores declaram não haver interesses.

## Fontes de financiamento

Esta pesquisa recebeu subsídio específico de agência de financiamento CNPq através dos projetos números: 141717/2019-0 e 200285/2021-1.

## Referências

- Asturiano, J.F., Cabrita, E., Horvath, A., 2017. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 245, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>
- Benson, J.D. 2015. Chapter 3 modeling and optimization of cryopreservation. In: *Methods in molecular biology.* 83-119. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_3](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_3)
- Billard, R., Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. *J. Exp. Zool.* 261, 122-131. <https://doi.org/10.1002/jez.1402610203>

- Borges, A.M., Araújo, K.O., Pivato, I., Navarro, R.D., 2020. Ultraestrutura e criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em cativo. Arq. Bras. Med. Veter. e Zootec. 72, 253–262. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10709>
- Boryshpolets, S., Kowalski, R.K., Dietrich, G.J., Dzyuba, B., Ciereszko, A., 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. Theriogenology. 80 (7), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.019>
- Campos, J.L. 2010. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: Baldisserotto B, Gomes LC, editors. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. 1st ed. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria. 335–361.
- Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni Filho E., Harvey, B.J. 2003. Sperm cryopreservation in the conservation of Brazilian migratory fish. J. Fish Biol. 63, 472-489. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>
- Castillo, J.A.M., Ramírez, L.R., Rodríguez, P.J.A., 2003. Ensayos de reproducción y alevinaje en Yaque *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) (Pises: Siluriformes: Pimelodidae) en la Orinoquia Colombiana. Memorias. Iv Seminario Internacional de Acuicultura I Congreso Nacional de Investigaciones Acuícolas, Septiembre, 10-12. Bogotá, Colomb.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Perez-Cerezales, S., Herraiz, P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. J. Appl. Ichthyol. 26, 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- FAO. 2019. ABS Elements: Elements to facilitate domestic implementation of access and benefit-sharing for different subsectors of genetic resources for food and agriculture – with explanatory notes. FAO, Rome. 84 pp Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fantini, L.E., Corrêa Filho, R.A.C., Martins, T.X., Laice, L.M., Seraphim, G.N., Silva, A.L. N., Povh, J.A., 2019. Growth curve comparison of native fish cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) and cachapinta hybrid (*P. reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans*). Aquaculture. 506, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.020>
- França T.S., Gomes I.C., Sanches E.A., Atehortúa M.P., Teixeira N.S., Rodrigues R.B., Freitas T.R., Galuppo A.G., Quirino M., Benato J.L., Machado T.L.F., Marques L.S., Bustamante-Filho I.C., Bortolozzo F.P., Streit Jr D.P. 2022. Post-thaw dilution of *Rhamdia quelen* sperm improves the reproductive success. Animal Reproduction Science. 243, 107018. [//doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107018](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107018)

- Galo, J.M., Streit Junior, D.P., Povh, J.A., Fornari, D.C., Resende, E.K., Oliveira, D., Ribeiro, R.P., 2014. Sperm quality of the Amazon catfish *Leiaris marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. *Braz. J. Biol.* 74 (4), 933–938. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.00313>
- Gallego, V., Pérez, L., Asturiano, J.F., Yoshida M. 2013. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture*. 416–417, 238–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.035>
- Gallego, V., Asturiano, J.F., 2019. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Rev. Aquac.* 11 (3), 697–724. <https://doi.org/10.1111/raq.12253>
- Gheller, S.M.M., Corcini, C.D., de Brito, C.R.C., Acosta, I.B., Tavares, G.C., Soares, S.L., Varela Junior, A.S., 2019. Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiaris marmoratus*. *Cryobiology*. 87, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.001>
- Hagedorn, M., Ricker, J., McCarthy, M., Meyers, S.A., Tiersch, T.R., Varga, Z.M., Kleinhans, F.W., 2009. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Cryobiology*. 58, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.09.013>
- Harvey, B., Carolsfeld, J. 1993. Preservation of sperm. In: *Induced breeding in tropical fish culture* Ottawa: International Development Research Center. 119-130.
- Hasanah, U., Alimuddin, A., Boediono, Abinawanto. 2020. Optimization of spermatozoa cryopreservation of Albino *pangasius catfish*: cryoprotectants with various concentrations and different equilibration times. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 441, 012088. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/441/1/012088>
- Hashimoto, D.T., Senhorini, J.A., Foresti, F., Porto-Foresti, F. 2012. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. *Rev. Aquac.* 4, 108–118. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01067.x>
- Hashimoto, D., Prado, F., Foresti, F., Porto-Foresti, F. 2016. Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: Risks for aquaculture production. *Neotropical Ichthyology*. 14, e150139. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150139>
- Hovatta, O. 2005. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. Reproductive BioMedicine Online*. 10 (6), 729-734, 2005. [http://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61116-9](http://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61116-9)
- Isachenko, V., Sánchez, R., Rahimi, G., Mallmann, P., Isachenko, E., Merzenich, M. 2019. Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa: fish as a model of human. *Andrologia*. 51 (1), 13166. <https://doi.org/10.1111/and.13166>

- Krause, R.A., Neumann G., de Oliveira Pedreira A.C., Syperreck, M.A., Malacarne, A.M., Braga, M.N.F., Cardoso, S.U., Bombardelli, R.A. 2021. *Rhamdia quelen's* semen pre-cryopreservation processing and sperm viability time after thawing. *Brazilian Journal of Development*. 7, 43131–43147. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-669>
- Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D., Li, J., 2015. 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.* 41, 413–422. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-99939>
- Lundberg, J.G., Littmann, M.W., 2003. Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferratis Jr, C.J., 2003. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. 432–446.
- Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F., Oliveira, A.V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*. 260, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.011>
- Maria, A.N., Azevedo, H.C., Carneiro, P.C.F. 2009. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. Pp. 47-63. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá, AP, Embrapa Amapá.
- Maria, A.N., Carneiro, P.C.F., 2012. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. *Ciência animal*. 22, 124–131.
- Martínez, J.G., Pardo, S.C. 2013. Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev Mvz Cordoba*. 18 (1), 3295-303. <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.191>
- Mora, J.A., Kossowski, C., 2006. Reproducción inducida del bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, (Gil, 1870) con aplicación de LHRHa. In XIII Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal, Guarico, Universidad Nacional Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos.
- Morris, J.P., Berghmans, S., Zahrieh, D., Neuberg, D.S., Kanki, J.P., Look, A.T. 2003. Zebrafish sperm cryopreservation with N,Ndimethylacetamide. *Biotechniques*. 35 (5), 956-968.
- Murgas, L.D.S., Felizardo V.O., Andrade E.S., Ferreira M.R., Paula D.A.J., Carvalho A.F.S. 2014. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory freshwater fish. *Recent advances in cryopreservation*. IntechOpen. 59–71. <https://doi.org/10.5772/58685>
- Murgas, L.D.S., Miliorini, A.B., Freitas, R.T.F., Pereira, G.J.M., 2007. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Rev. Bras. Zootec.* 36,

526–531. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000300002>

Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*. 472, 21–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021>.

Nascimento, A.F., Gonçalves, A.C.S., Reis-Neto, R.V., Leal, M.C., Viveiros, A.T.M. 2012. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). *Animal Reproduction*. 9 (2), 103–110. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.041>

Neyrão, I. M. 2022. Criopreservação em sêmen de peixes: revisão de protocolos experimentais e novas percepções. Porto Alegre: UFRGS, Brasil.72.

Spica, N.L., Sanches, E.A., Streit Junior., D.P., Corrêa Filho, R.A.C., Brasileiro, L.O., Rodrigues, R.B., Kasai, R.Y.D., D.P., Povh, J.A., 2021. Successive seminal collections from *Leiarius marmoratus* during the reproductive period. *Animal Reproduction Science*. 234 (4), 106852. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106852>

Streit Jr., D.P., Benites, C., de Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Sakaguti, E.S., Caldieri, R.F. 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciencia Anim. Bras*. 7 (3), 289–297.

Suquet, M., Cosson, J., de la Gándara, F., Mylonas, C.C., Papadaki, M., Lallemand, S., Fauvel, C., 2010. Sperm features of captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *J. Appl. Ichthyol*. 26, 775–778. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01533.x>

Viveiros, A.T.M., Godinho, H.P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem*. 35 ,137–150. <http://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>

Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Streit Jr, D.P., Rizzoto, G., Jardim, R.D., Lucia Jr, T., Figueiredo, M.R.C. 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Atlântica*. 34 (2), 129–137. <http://doi.org/10.5088/atl.2012.34.2.129>

Viveiros, A.T.M. 2011. Current status of sperm cryopreservation in siluriform catfishes. In: TIERSCH, T.R., GREEN, C.C. (Ed.). *Cryopreservation in aquatic species*. 2.ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society. 387-397.

Viveiros, A.T.M., Nascimento, A.F., Orfão, L.H., Isaú, Z.A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 74 (4), 551–56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.018>

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system

based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*. 67, 661–672. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>.

Yasui, G.S., Senhorini, J.A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L.S.O., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., Silva, L.A., 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*. 9 (3), 464–470. <https://doi.org/10.1017/S175173111400251>

Yavas, I., Bozkurt, Y. 2011. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Biotechnol*. 25, 2254-2257. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0018>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar grande influência do crioprotetor permeável sobre as variáveis cinéticas do sêmen criopreservado da espécie. Para o descongelamento de amostras criopreservadas, a metodologia de 45 °C pelo tempo de 5 segundos teve bons resultados para as variáveis analisadas. A manutenção das amostras por apenas 2 horas no Dry-Shipper já é suficiente para realização da curva de congelamento eficiente para essa espécie. A utilização do metanol como crioprotetor permeável no congelamento seminal para *L. marmoratus* apresentou bons resultados, visto via análises cinéticas e de viabilidade celular. Assim, o presente estudo atendeu a todos os objetivos propostos inicialmente, sendo possível, realizar um congelamento seminal para espécie alvo do estudo e obter bons resultados ao descongelar as amostras seminais utilizando metanol como protocolo de congelamento.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. Ê. X. S. *et al.* Ovopel and carp pituitary extract as spawning inducers in males of the Amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, p. 882–886, 2014.
- ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVÁTH, Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 69–76, 2017.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- BARROS, R. P. *et al.* Crude protein requirements in feeding for hybrid jundiara (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *Leiarius marmoratus*). **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 9, n. 8, [art.] e978986866, [p. 1-17], 2020.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, n. 4391, p. 1189–1190, Dec. 1953.
- BORGES, A. M. *et al.* Ultraestrutura e criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em cativeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 72, n. 1, p. 253–262, 2020.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.
- CARVALHO, H. R. **Status da reprodução de espécies nativas de peixes do Brasil**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- CASTILLO, J. A. M.; RAMÍREZ, L. R.; RODRÍGUEZ, P. J. A. Ensayos de reproducción y alevinaje em yanque *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) (Pises:Siluriformes:Pimelodidae) en la Orinoquia Colombiana. *In*: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIONES ACUÍCOLAS, 6.; CONGRESSO NACIONAL DE INVESTIGAÇÕES AQUÍCOLAS, 1., 2003, Bogotá, 2003. **Memorias**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2003.
- CHAO, N.-H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 161–189, 2001.
- CHEUICHE, Z. M. G. **Vitrificação de embriões *Mus domesticus domesticus* envazados em microcapilares de quartzo**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,



Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CIERESZKO, A. *et al.* Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 7, p. 1353–1364, 2004.

COLPO, C. V. *et al.* Rendimento e viabilidade da extração de hipófise de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 901–903, 2011.

DAS, S. K. Evaluation of a new spawning agent, ovopel in induced breeding of indian carps. **Asian Fisheries Science**, Serdang, v. 17, n. 4, p. 313-322, 2004.

DIETRICH, M. A.; IRNAZAROW, I.; CIERESZKO, A. Proteomic identification of seminal plasma proteins related to the freezability of carp semen. **Journal Proteomics**, Amsterdam, v. 162, p. 52-61, 2017.

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

FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709–714, 2007.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 45–53, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2023.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture: meeting the sustainable development goals**. Rome: FAO, 2018. Disponível em: [www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf](http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf). Acesso em: 25 set. 2023.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Novo relatório da FAO aponta que produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até 2025**. Rome: FAO, 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J. G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 47, n. 6, p. 1691-1705, 2016.

GALO, J. M. *et al.* Oocyte quality of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the reproductive season. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 2, p. 279–284, 2015.

GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, San Antonio, v. 41, n. 4, p. 187–196, Jan. 2000.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 30, n. 6, p. 820-832, 2018.

GARCEZ, J. R. *et al.* Reprodução induzida de peixes nativos para fortalecimento da piscicultura na mesorregião do Alto Solimões. *In*: CORDEIRO, C. A. M.; SAMPAIO, D. S.; HOLANDA, F. C. A. F. (org.). **Engenharia de pesca: aspectos teóricos e práticos**. Guarujá: Científica Digital, 2021. p. 293–310.

GHELLER, M. M. *et al.* Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiaris marmoratus*. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 87, p. 74–77, 2019.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GROUT, B.; MORRIS, J.; MCLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, n. 10, p. 293-297, 1990.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, London, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010.

HAZIN, F. H. V. A pesca na zona econômica exclusiva, ZEE: sua importância para o Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v. 1, n. 1, p. 10-18, 2006.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.

KIME, D. E. *et al.* Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 130, n. 4, p. 425–433, 2001.

KOWALSKI, R. K.; CEJKO, B. I. Sperm quality in fish: determinants and affecting factors. **Theriogenology**, New York, v. 135, p. 94-108, 2019.

LEITE, L. V. *et al.* Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 421–429, abr. 2013.

LIMA, I. M. A. F. **Uma abordagem ergonômica para análise da qualidade do pescado, desde sua captura ao seu desembarque na praia, resultante da atividade dos jangadeiros de Ponta Negra-Natal/RN**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). *In*:

- REIS, R. E.; CULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (org.). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 432-446.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. *In*: TAVARES-DIAS, M. (ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 47-63.
- MARTINS, E. F. F. **Análise reprodutiva de machos e fêmeas da espécie Tambaqui (*Colossoma macropomum* – CUVIER, 1818) submetidos a diferentes indutores hormonais**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Cuiabá, 2011.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 4, p. 594–604, 2009.
- MATEO, F. J.; ROJAS, H. L. Comparación alométrica entre los híbridos yaque pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *Leiarius marmoratus*) y chorrosco (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *Pimelodus blochi*) (Siluriformes: Pimelodidae). **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, Maracaibo, v. 46, n. 2, p. 87-97, 2005.
- MATTHEWS, J. L. *et al.* Changes to extender, cryoprotective medium, and *in vitro* fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. **Zebrafish**, New York, v. 15, p. 279–290, 2018.
- MIRA, L. T.; MEDINA, R. M.; CRUZ, C. P. Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v. 15, n. 2, p. 2070-2077, 2010.
- MORA, J. A.; KOSSOWSKI, C. Reproducción inducida del bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, (Gil, 1870) con aplicación de LHRHa. *In*: CONGRESO VENEZOLANO DE PRODUCCIÓN E INDUSTRIA ANIMAL, 13., 2006, San Juan de Los Morros - Venezuela. **Memorias**. Guarico: Universidad Nacional Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos, 2006.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- NYNCA, J. *et al.* Cryopreservation-induced alterations in protein composition of rainbow trout semen. **Proteomics**, Amsterdam, v. 15, n. 15, p. 2643–2654, 2015.

PEIXE BR. **Anuário brasileiro da piscicultura peixe BR 2023**. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2023. 65 p. Disponível em: [https://www.aen.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2023-03/anuariopeixebr2023.pdf](https://www.aen.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2023-03/anuariopeixebr2023.pdf) . Acesso em: 25 dez. 2023.

PEIXE BR. **Anuário brasileiro da piscicultura peixe BR 2024**. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2024. 63 p. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

PERCHEC, G. *et al.* Relationship between sperm atp content and motility of carp spermatozoa. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 747–753, Feb. 1995.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

RAMIREZ GIL, H.; AJIACO MARTINEZ, R. E.; VALDERRAMA BARCO, M. **Reseña sobre la pesca de especies de consumo y ornamentales en la Orinoquia colombiana**. Santa Fe de Bogotá: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, 1997.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**, São Carlos, v. 8, p. 58–61, 2012.

ROBLES, V. *et al.* Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 30–39, Aug. 2003.

ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 3, p. 508-516, 2013.

SONODA, D. Y. *et al.* Demand for fisheries products in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 5, p. 313–319, 2012.

SUQUET, M. *et al.* Sperm features of captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 775–778, 2010.

SZTEIN, J. M.; TAKEO, T.; NAKAGATA, N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 82, p. 57-63, 2018.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, 2009.

TIERSCH, T. R. Cryopreservation in aquarium fishes. **Marine Biotechnology**, Berlin, v. 3, n. 1, p. 212-223, 2001.

TIERSCH, T.T.; GREEN, C. **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed.

Sorrento: The World Aquaculture Society, 2011. v. 2, 1003 p.

TOTH, G. P. *et al.* Computer-assisted motion analysis of sperm from the common carp. **Journal of Fish Biology**, London, v. 47, n. 6, p. 986–1003, 1995.

XIN, M. *et al.* Progress and challenges of fish sperm vitrification: a mini review. **Theriogenology**, New York, v. 98, p. 16–22, 2017.

YANG, H. *et al.* A procedure-spanning analysis of plasma membrane integrity for assessment of cell viability in sperm cryopreservation of zebrafish *Danio rerio*. **Zebrafish**, Nova York, v. 13, n. 2, p. 144-151, 2016.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. *In*: CYRINO, J. E. P. *et al.* (ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: [s. n.], 2004. p. 45-73.

## APÊNDICE 1 - AQUACULTURE - GUIDE FOR AUTHORS

### Article structure

#### Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### Results

Results should be clear and concise.

#### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and

equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Numbering.** Manuscripts that are sequentially numbered (e.g., I, II, etc.) are no longer accepted.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be not longer than 400 words.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Highlights of the manuscript**

As part of the submission process, authors are required to provide 3 or 4 highlights, each one sentence long. Beyond stating key discoveries, these highlights must explicitly establish why the work is novel and why it has an application to aquaculture. It is not sufficient to state that the species is one that is farmed.

### **Cover letter**

A cover letter stating why you would like to submit to Aquaculture should be uploaded. Please complete and upload the Cover letter.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.



If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry for further information.

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

### **Math formulae**

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup> and not Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### **Electronic artwork**

#### **General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color

vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### **Formats:**

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

IFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### **Color artwork:**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### **Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Text graphics**

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## **References Citation**

### **Intext**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### **Reference links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Data references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data

repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown...

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003). Reference to a dataset:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini,

G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

### **Journal Abbreviations Source**

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the Electronicartwok.

## APÊNDICE 2 – CERTIFICADO CEUA



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação reprodutiva de machos e fêmeas de espécies reofílicas: indutores hormonais, retorno reprodutivo e sistemas reprodutivos”, registrada com o nº 1.083/2019, sob a responsabilidade de **Jayme Aparecido Povh** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 26/09/2019.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2019 a 31/10/2023
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Astyanax spp. / Lambari, Piaractus mesopotamicus / Pacu, Colossoma macropomum / Tambaqui, Prochilodus lienatus / Curimba, Brycon hilarii / Piraputanga, Leiarius marmoratus / Jundiá amazônico, Pseudoplatystoma corruscans / Pintado, Pseudoplatystoma reticulatum / Cachara</i>
Nº de animais	110 (55 machos + 55 fêmeas) de cada espécie
Peso/Idade	10 g / 1 ano, 3000 g / 3 anos, 6000 g / 3 anos, 1000 g / 2 anos, 1000 g / 2 anos, 4000 g / 3 anos, 6000 g / 3 anos, 4000 g / 3 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Estação Experimental de Piscicultura da UFMS (Campo Grande/MS); Setor de Piscicultura da UFMS (Terenos/MS); Piscicultura Pirai Terenos/MS).

Fábio José Carvalho Faria  
Coordenador da CEUA/UFMS  
Campo Grande, 30 de setembro de 2019.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site: [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1526228** e o código CRC **32DE2036**.

## VITA

Eduardo Thomé Nicoleti filho de Sidnei José Nicoleti e Marlisete Roselaine Thomé, é natural de Chiapetta no estado do Rio Grande do Sul, nascido em 18 de setembro de 1997.

Concluiu o ensino médio no Instituto Federal do Rio Grande do Sul campus Bento Gonçalves, como formação médio técnico no curso Técnico em Agropecuária e a graduação em Palmeira das Missões, pela Universidade Federal de Santa Maria, no curso de bacharel em Zootecnia em 2022.

Iniciou a Pós graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 2022, na área de Produção Animal, sendo bolsista CAPES. Nesse período realizou atividades de pesquisa e ensino no Grupo de Pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas), com foco principal no desenvolvimento e aprimoramentos de técnicas voltadas as metodologias de reprodução, avaliação de qualidade e criopreservação de gametas de peixes nativos.