

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

**THALES DE SOUZA FRANÇA**

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LOW-COST AND  
ENVIRONMENT-FRIENDLY TECHNIQUES FOR FISH SPERM  
CRYOPRESERVATION**

**Porto Alegre  
2024**

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

THALES DE SOUZA FRANÇA

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LOW-COST AND  
ENVIRONMENT-FRIENDLY TECHNIQUES FOR FISH SPERM  
CRYOPRESERVATION**

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do Grau de Doutora em  
Zootecnia, na Faculdade de Agronomia,  
da Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit  
Jr.

Coorientador: Prof. Dr. Juan Francisco  
Asturiano Nemesio.

Porto Alegre (RS), Brasil  
Abril 2024

## CIP - Catalogação na Publicação

França, Thales de Souza

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LOW-COST AND ENVIRONMENT-FRIENDLY TECHNIQUES FOR FISH SPERM CRYOPRESERVATION / Thales de Souza França. -- 2024. 45 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Coorientador: Juan Francisco Asturiano.

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

1. Diluição de sêmen. 2. Cápsulas rígidas de gelatina. 3. Cápsulas rígidas de HPMC. 4. Reprodução de peixes. 5. Criopreservação. I. Streit Jr, Danilo Pedro, orient. II. Asturiano, Juan Francisco, coorient. III. Título.


Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Thales de Souza França  
Mestre em Zootecnia

**TESE**


Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
**DOCTOR EM ZOOTECNIA**  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 16.04.2024  
Pela Banca Examinadora

 Documento assinado digitalmente  
DANILO PEDRO STREET JR  
Data: 20/02/2024 06:26:40 -0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Danilo Pedro Street Jr  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

Homologado em: 22/05/2024  
Por

 Ines Andretta  
Assinado de forma digital por Ines  
Andretta  
Data: 2024.05.24 10:25:56 -0300

INES ANDRETTA  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

Daniel Źarski

 2024.04.29  
14:11:41 +02'00'

Daniel Zarski  
Polish Academy of Sciences -PL

PAREDES ROSENDO  
ESTEFANIA -  
531154795  
Digitally signed by PAREDES ROSENDO  
ESTEFANIA - 531154795  
DN: cn=PAREDES ROSENDO ESTEFANIA - 531154795,  
c=BR  
Date: 2024.04.29 13:11:41 +02'00'  
Adobe Acrobat version: 9.0.4 (62.2007)

Estefania Paredes Rosendo  
UVigo-ES

JUAN FRANCISCO |  
ASTURIANO |  
NEMESIO  
Firmado digitalmente por JUAN  
FRANCISCO (ASTURIANO )  
NEMESIO  
Fecha: 2024.04.18 17:50:28  
+02'00'

Juan Francisco Asturiano Nemesio  
UPV-ES

HERRAEZ  
ORTEGA MARIA  
PAZ - 097362835  
Firmado digitalmente por  
HERRAEZ ORTEGA MARIA  
PAZ - 097362835  
Fecha: 2024.04.25 11:24:36  
+02'00'

Paz Herraез Ortega  
ULE-ES

 Documento assinado digitalmente  
PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
Data: 27/05/2024 07:46:57 -0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

## AGRADECIMENTOS

Primeiro eu gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida. Agradeço a minha noiva Beatriz Sampaio por ter me acompanhado e apoiado em cada segundo dessa jornada. A minha mãe, Maria Alice França, ao meu pai, Jorge França (in memoriam) e ao meu irmão, Thácio França por todo o suporte e confiança. Aos meus sogros Ricardo e Claudia Sampaio por me incentivarem e apoiarem em cada momento. Somente vocês sabem e viveram comigo todos os momentos para eu conseguir chegar até aqui.

Eu gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Danilo Streit Jr. por não ser somente um orientador, mas um mentor e grande amigo durante todo esse percurso. E acima de tudo, por ter confiado em mim e no meu trabalho. Também agradeço a todos membros da equipe AQUAM – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil pelo companheirismo, ensinamentos e esforços para que a realização deste trabalho fosse possível.

Me gustaría agradecer a los catedráticos Dr. Juan Asturiano y Dra. Luz Pérez por la orientación, confianza y por acogerme tan bien en España. Gracias también a todo el equipo del Grupo de Acuicultura y Biodiversidad (Sección de Investigación en Reproducción de Peces para la Acuicultura y la Conservación) de la Universitat Politècnica de València por la amistad y esfuerzos para el éxito de la tesis.

Agradeço aos meus orientadores do passado, Prof. Dra. Ana Viveiros, Dr. Marcelo Leal e Prof. Dr. Luis Murgas por todos os ensinamentos que com certeza foram essenciais para a conclusão desta tese. E também deixo aqui o meu agradecimento aos professores doutores Eduardo Sanches e Diógenes Siqueira Silva pelos valiosos conselhos que contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional.

Finally, I thank the postgraduate programs I was part of, the entities that financed my studies, the thesis evaluators and all the people who contributed to the thesis in some way.

# DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE BAIXO CUSTO E IMPACTO AMBIENTAL PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES

Autor: Thales de Souza França

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr

Coorientador: Juan Francisco Asturiano Nemesio

A criopreservação de sêmen de peixes é uma técnica que pode aumentar a eficiência da reprodução em cativeiro de espécies de peixes. Durante as últimas décadas, foram estabelecidos protocolos para criopreservação do sêmen de diversas espécies de peixes. Porém, os pesquisadores negligenciam o período em que os gametas ficam em contato com a solução crioprotetora após o descongelamento. A exposição dos espermatozoides às soluções crioprotetoras após o descongelamento pode ser tóxica às células. A maioria dos protocolos estabelecidos utilizam recipientes plásticos ultra resistentes para armazenar o sêmen durante a criopreservação. Esses recipientes normalmente não são reutilizados, gerando resíduos altamente poluentes ao meio ambiente. Assim, o principal objetivo da tese foi criar e testar metodologias de baixo custo que potencializem o uso de espermatozoides descongelados de peixes e torne o processo de criopreservação de sêmen menos poluente ao meio ambiente. Nos experimentos dos capítulos 2 e 3 utilizamos o jundiá cinza *Rhamdia quelen*, espécie considerada modelo experimental para os peixes nativos sul-americanos. No capítulo 2, testamos o uso da diluição do sêmen descongelado para diminuir a toxicidade da solução crioprotetora. As amostras descongeladas de sêmen de jundiá cinza foram diluídas em um diluidor salino (NaCl). Observamos que os espermatozoides das amostras diluídas apresentaram maiores velocidades e capacidade reprodutiva que as amostras não diluídas. Desta forma, a diluição do sêmen descongelado de jundiá se mostrou que deve ser incluída no protocolo de criopreservação do sêmen da espécie. Nos capítulos 3 e 4 desenvolvemos e testamos a metodologia de uso das cápsulas de gelatina e das cápsulas de hipromelose como um recipiente alternativo ao uso das palhetas plásticas na criopreservação do sêmen de peixes. No segundo capítulo, observamos que as cápsulas biodegradáveis mantiveram os parâmetros cinéticos e a capacidade reprodutiva dos espermatozoides de jundiá cinza tão bem quanto as palhetas plásticas. Assim, as cápsulas podem ser utilizadas como um recipiente alternativo ao uso das palhetas plásticas na criopreservação de sêmen dessa espécie. O experimento do capítulo 4 foi realizado na Espanha. Nós aplicamos a metodologia desenvolvida no capítulo 3 para a criopreservação do sêmen de enguia europeia *Anguilla anguilla*, dourada *Sparus aurata* e robalo europeu *Dicentrarchus labrax*. Nessas três espécies, as cápsulas biodegradáveis preservaram os parâmetros cinéticos e a integridade de membrana dos espermatozoides tão bem quanto as palhetas plásticas. Observamos que os danos de DNA das amostras de sêmen de enguia europeia e robalo europeu criopreservadas em cápsulas e palhetas não se diferiram. Por outro lado, as amostras de sêmen de dourada mostraram maior dano de DNA. Porém, o nível de dano que observamos nas amostras armazenadas em cápsulas é considerado baixo, assim podem não comprometer o desenvolvimento embrionário. Concluímos que as cápsulas de gelatina e as cápsulas biodegradáveis de hipromelose podem ser utilizadas como recipientes alternativos ao uso das palhetas plásticas para a criopreservação do sêmen das três espécies de peixes mediterrâneas.

**Palavras-chave:** Diluição de sêmen, cápsulas rígidas de gelatina, cápsulas rígidas de HPMC, reprodução de peixe.

# DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LOW-COST AND ENVIRONMENT-FRIENDLY TECHNIQUES FOR FISH SPERM CRYOPRESERVATION

Author: Thales de Souza França

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr

Co-advisor: Juan Francisco Asturiano Nemesio

Fish sperm cryopreservation is a technique that can increase the reproduction in captive efficiency of fishes. Over the last few decades, protocols for sperm cryopreservation from many fishes have been established. However, the researchers neglecting the period in which the gametes remain in contact with the cryoprotective solution until fertilization. Exposure of sperm to cryoprotectant solutions after thawing can be toxic to the gametes. The vast majority of the established protocols use ultra-resistant plastic containers to store sperm during the cryopreservation process. These containers usually are not reused, generating highly polluting waste for the environment. Thus, the main objective of the thesis was to create and test low-cost methodologies that enhance the use of fish post-thaw sperm and make the sperm cryopreservation process more environmentally friendly. The experiments in the Chapters 2 and 3 were developed in Brazil. We used the South American silver catfish *Rhamdia quelen*, a species considered an experimental model for native South American fishes. In vitro fertilization and sperm cryopreservation protocols for the species were already established; thus, we based our work on these protocols to apply innovations. In Chapter 2, we tested the use of post-thawing dilution to reduce the toxicity of the cryoprotectant solution. This technique is commonly used in mammalian sperm cryopreservation protocols but has never before been applied to post-thaw sperm of South American fishes. South American silver catfish post-thaw sperm samples were diluted in a saline extender (NaCl). The post-thaw sperm diluted samples showed higher velocities and reproductive capacity than the undiluted samples (control). Thus, the post-thawing sperm dilution methodology should be included in the silver catfish sperm cryopreservation protocol. In Chapters 3 and 4, we developed, tested, and described the methodology for using biodegradable gelatin (collagen) and hypromellose (HPMC) capsules as an alternative container to plastic straws in the fish sperm cryopreservation. In the second chapter, we observed that the biodegradable capsules maintained the kinetic parameters and reproductive capacity of South American silver catfish sperm just as effectively as plastic straws. The results indicated that the capsules could be an alternative container to plastic straws in the silver catfish sperm cryopreservation. The experimental procedures in Chapter 4 were performed in Spain. We apply the methodology developed in Chapter 3 to the cryopreservation of sperm from European eel *Anguilla anguilla*, gilthead seabream *Sparus aurata*, and European sea bass *Dicentrarchus labrax*. In these three species, biodegradable capsules preserved the sperm kinetic parameters and membrane integrity just as effectively plastic straws. We observed that DNA damage in European eel and European sea bass sperm samples cryopreserved in capsules and straws did not differ. On the other hand, gilthead seabream sperm samples showed higher DNA damage than those cryopreserved in straws. However, the damage level observed in samples stored in capsules is considered low, thus, may not compromise embryonic development. We observed the results and concluded that biodegradable gelatin and HPMC capsules could be used as alternative containers to plastic straws for sperm cryopreservation from the three aquaculture Mediterranean fish species.

**Keywords:** Sperm dilution, hard-gelatin capsules, hard-gelatin HPMC, fish reproduction.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

- Figura 1** – Recipientes plásticos usados para a criopreservação de sêmen de peixes, palhetas (a – 0,25; b – 0,5 mL) e criotubos (c – 1,8; d – 3,5; e – 4,5 mL).....15
- Figura 2** – Tamanhos, comprimento (mm e polegadas) e volume das cápsulas rígidas. A espessura da parede das cápsulas de acordo com o tamanho são: 0,11 mm (000); 0,107 mm (00); 0,104 mm (0); 0,102 mm (1); 0,99 mm (2); 0,091 mm (3); 0,089 mm (4) e 0,086 mm (5).....17
- Figura 3** – Jundiá cinza *Rhamdia quelen*.....21
- Figura 4.** Ciclo de vida catádromo da enguia europeia *Anguilla anguilla*. Os reprodutores realizam (1) migração reprodutiva dos rios continentais europeus para o Mar dos Sargaços, cruzando o Oceano Atlântico. A reprodução (2) ocorre no Mar dos Sargaços e, após a eclosão, as larvas leptocéfalo (3) são transportadas para o continente europeu pelas correntes do Oceano Atlântico. Chegando ao litoral do continente europeu, sofrem metamorfose e se transformam em enguias de vidro (4). Em seguida, entram nos rios continentais e continuam crescendo, passando pelas fases marron (5) e amarela (6) até atingirem a fase de migração reprodutiva (1).....23
- Figura 5.** Enguia europeia *Anguilla anguilla*.....23
- Figura 6.** Dourada *Sparus aurata*.....24
- Figura 7.** Robalo europeu *Dicentrarchus labrax*.....25



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Criopreservação de sêmen de peixes.....	14
2.1.1. Criopreservação.....	14
2.1.2. História.....	14
2.1.3. Recipientes.....	15
2.1.4. Diluidores.....	17
2.1.5. Crioprotetores.....	18
2.1.6. Congelamento e descongelamento.....	19
2.1.7. Aplicação.....	20
2.2 Jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	21
2.3 Enguia europeia ( <i>Anguilla anguilla</i> ).....	22
2.4 Dourada ( <i>Sparus aurata</i> ).....	24
2.5 Robalo europeu ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ).....	25
3. PROJETOS, BOLSAS E EMPRESAS ENVOLVIDAS NESTA TESE.....	26
4. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	28
4.1 Hipóteses.....	28
4.2 Objetivos.....	28
4.2.1. Geral.....	28
4.2.2. Específicos.....	28
CAPÍTULO II.....	29
CAPÍTULO III.....	30
CAPÍTULO IV.....	31
CAPÍTULO V.....	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICES.....	41
1. APÊNDICE A.....	41
2. APÊNDICE B.....	43
3. APÊNDICE C.....	44
4. APÊNDICE D.....	45

## **CAPITULO I**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A criobiologia é a ciência em que estuda a vida em baixas temperaturas. Os conhecimentos gerados por essa ciência permitiram a criação de protocolos de criopreservação capazes de manter células viáveis das mais variadas espécies animais e vegetais por tempo indeterminado (SZTEIN et al., 2018). Atualmente a criopreservação desempenha um papel crucial na manutenção genética de organismo vivos por meio dos criobancos, na reprodução humana e de animais, no desenvolvimento de vacinas, transporte e transplantes de órgãos, entre outras atividades de suma importância para os seres humanos (MURRAY & GIBSON, 2022). Na aquicultura a criopreservação de sêmen de peixes já está presente na produção, porém de forma discreta se comparada a bovinocultura de leite e de corte (CABRITA et al., 2022). Contudo, com o aumento constante da produção em cativeiro e do uso de biotecnologias na produção de peixes, além da diminuição dos estoques naturais das espécies (FAO, 2022a), a criopreservação de sêmen de peixes tende cada vez mais estar presente na aquicultura e na conservação dos estoques naturais. Por esse motivo, se faz necessário o aprimoramento de protocolos e o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo visando tornar a criopreservação de sêmen de peixes mais acessível e eficiente do ponto de vista prático e ambiental.

Ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos protocolos para a criopreservação de sêmen de diversas espécies de peixes (CABRITA et al., 2022). Para o sucesso destes protocolos, as soluções crioprotetoras são usadas para a proteção das células durante o processo de criopreservação. Estas soluções são compostas pelo(s) crioprotetor(es) e o diluidor. Juntas, estas substâncias conferem uma maior estabilidade físico-química do meio, permitindo que as células possam ser congeladas, mantidas a temperaturas exatamente baixas (-80 a -196 °C) e depois retomarem suas atividades fisiológicas após o descongelamento (JAWAHAR & BETSY, 2020). Os crioprotetores tem o objetivo de abaixar o ponto de fusão da água intracelular e extracelular, evitando assim a formação de cristais de gelo que causam danos irreversíveis e até mesmo a morte da célula (MAZUR, 1970, 1972). Os crioprotetores são classificados em dois grupos: os permeáveis, que são substâncias de baixo peso molecular que conseguem adentrar as células passando pelos poros da membrana plasmática. Sendo os mais utilizados o metanol, o dimetil sulfoxido e o glicerol (JAWAHAR & BETSY, 2020). Vale ressaltar que estas substâncias podem ser tóxicas às células em temperatura ambiente (BEST, 2015), portanto a concentração utilizada na solução crioprotetora e o ambiente de

manipulação devem ser bem calculados e controlados. O outro grupo de crioprotetores são os não-permeáveis, estes apresentam um peso molecular que impossibilita a passagem através da membrana plasmática, realizando então a proteção de forma extracelular. Os comumente utilizados desse grupo são a glicose, sacarose, frutose, trealose, gema de ovo, leite em pó e as proteínas anti-freeze (JAWAHAR & BETSY, 2020). A solução diluidora pode ser composta por uma ou mais substâncias. Normalmente ela é composta por sais, como o NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, entre outros. Além de também poder ser enriquecida com açúcar e uma substância tampão, como por exemplo a glicose e o TRIS respectivamente. A solução diluidora, também conhecida como diluidor tem como principais objetivos: inibir a ativação dos espermatozoides, prolongar a viabilidade do sêmen, manter o pH intracelular, inibir o crescimento bacteriano e fornecer energia aos espermatozoides (JAWAHAR & BETSY, 2020).

No desenvolvimento dos protocolos de criopreservação do sêmen de peixes o objetivo dos pesquisadores sempre foi focado em obter espermatozoides de qualidade imediatamente depois do descongelamento das amostras, negligenciando o período em que o sêmen ficava em contato com a solução crioprotetora. Em protocolos de criopreservação de sêmen de mamíferos é recorrente a uso da diluição do sêmen descongelando em uma solução. Essa etapa no protocolo é realizada para diminuir a concentração dos crioprotetores permeáveis, reduzindo a toxicidade do meio e conseqüentemente mitigar os danos causados aos espermatozoides. Danos estes que podem causar a diminuição da capacidade reprodutiva espermática, diminuindo a taxa de fertilização (ALVARENGA et al., 2012). Existem protocolos de criopreservação de sêmen de peixes que realizam a diluição do sêmen descongelando, porém com o objetivo de aumentar o tamanho da amostra (RODRIGUES et al., 2021) e não para reduzir a toxicidade da solução crioprotetora em temperatura ambiente.

Os recipientes utilizados para armazenar o sêmen durante o processo de criopreservação são essenciais para o sucesso da aplicação da técnica. Eles devem apresentar algumas características, como serem fáceis de armazenar, identificar e de serem adquiridos no mercado. Atualmente, por mais que outros recipientes para o armazenamento das amostras de sêmen em nitrogênio líquido já tenham sido testados, a maioria dos protocolos preconizam o uso das palhetas plásticas e dos criotubos (YANG & HUO, 2022). Ambos, são feitos utilizando compostos plásticos ultra resistentes que podem ser reciclados. Porém, como entram em contato com material biológico, eles

devem ser esterilizados antes do processo de reciclagem, fazendo com que geralmente estes recipientes sejam descartados e não reciclados. Assim se tornando um dejetto de alto potencial poluente para o meio ambiente.

As cápsulas rígidas de gelatina e hipromelose, são recipientes amplamente utilizados pela indústria farmacêutica para a administração de medicamentos, vitaminas, minerais, suplementos alimentares e outras substâncias (ZILHADIA et al., 2022). Estas cápsulas apresentam características como, biocompatibilidade, solubilidade em água, acessíveis no mercado e serem fabricadas a partir de polímeros biodegradáveis. A gelatina é um composto proveniente do colágeno animal e a hipromelose tem origem na celulose presente nos vegetais (AL-TABAKHA, 2010; LING, 1978). Assim, ambas as cápsulas rígidas são consideradas recipientes biodegradáveis. Desta forma, as cápsulas rígidas se mostram possíveis recipientes biodegradáveis alternativos ao uso dos recipientes compostos por plásticos ultra resistente para a criopreservação de células.

Partindo dos conhecimentos explícitos acima, este estudo buscou entender, criar e adaptar novas metodologias para tornar o processo de criopreservação de sêmen de peixes mais produtivo, acessível, barato e sustentável do ponto de vista ambiental. Para elucidar e se aprofundar no tema criopreservação de sêmen de peixes, a presente tese foi subdividida em quatro capítulos; O *Capítulo I* contendo a introdução geral, abordando basicamente a estrutura da tese e os conceitos. No *Capítulo II* foi criada e testada o uso da diluição do sêmen descongelado de jundiá cinza *Rhamdia quelen*. Onde foram observados os efeitos desta técnica sobre a qualidade do sêmen e a sua capacidade reprodutiva. No *Capítulo III* foi criado e testado o protocolo de criopreservação de sêmen utilizando as cápsulas rígidas de gelatina e as cápsulas rígidas de hipromelose. Além disto, os resultados de qualidade e capacidade reprodutiva das amostras de sêmen criopreservadas em cápsulas biodegradáveis foram comparados com as amostras estocadas em palhetas plásticas, com o intuito de observar se as cápsulas podem ser utilizadas como recipientes alternativos às palhetas no processo de criopreservação de sêmen. No *Capítulo IV*, observou-se a possibilidade das cápsulas rígidas de gelatina e das cápsulas rígidas de hipromelose serem utilizadas como um recipiente alternativo às palhetas plásticas na criopreservação de sêmen de espécies de peixes mediterrâneos. Para isto, a qualidade das amostras de sêmen de enguia europeia (*Anguilla anguilla*), dourada (*Sparus aurata*) e robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) criopreservadas em palhetas

plástica, cápsulas rígidas de gelatina e em cápsulas rígidas de hipromelose foram comparadas. Após os quatro capítulos, a conclusões geral e específicas desta tese.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste tópico serão expostos conceitos teóricos e práticos sobre criopreservação de sêmen de peixes e sobre as espécies de peixes utilizadas nos estudos que compõe a presente tese.

### **2.1 Criopreservação de sêmen de peixes**

#### **2.1.1. Criopreservação**

As metodologias de criopreservação foram desenvolvidas com base no conhecimento da criobiologia, ciência que estuda a vida em baixas temperaturas e tem como objeto de estudo qualquer material biológico em temperatura inferior à sua faixa fisiológica. A criopreservação é definida como a conservação da viabilidade de células, tecidos e órgãos a baixas temperaturas em quiescência, promovendo a cessação das reações bioquímicas e restaurando as atividades metabólicas após o descongelamento (MAZUR, 1970). Os materiais biológicos de interesse são geralmente armazenados de acordo com seu prazo de validade. Se as amostras forem utilizadas por um curto período de tempo, elas serão armazenadas a 4 °C; esta técnica é conhecida como armazenamento de curto prazo. Porém, se o objetivo é manter as células por muito tempo, aplica-se a técnica de longo prazo, onde as amostras são armazenadas em ultrafreezer (-80 °C), suspensas em cilindros de vapor de nitrogênio líquido (-170 °C). C), ou imersos em nitrogênio líquido (-196 °C). Em temperaturas tão baixas, os níveis de energia cinética são demasiado baixos para permitir a movimentação das moléculas, promovendo a conservação do material (MAZUR, 1984).

#### **2.1.2. História**

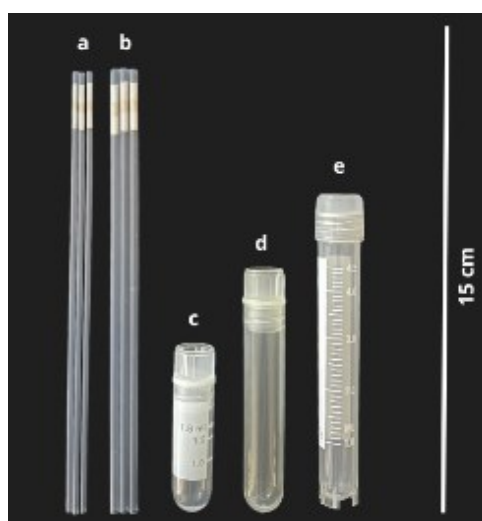
De acordo com Sztein et al. (2018), a criobiologia é estudada há séculos. Em 1776, Lazzaro Spallanzani descreveu a sobrevivência de espermatozoides de humanos, cães, touros, cavalos, sapos e salamandras em ambientes quentes e frios (SPALLANZANI, 1776). Em 1866, Paolo Mantegazza, físico, antropólogo e visionário, observou amostras de esperma de humanos e sapos congelados a -14 e -17 °C. Além disso, ele imaginou que a manutenção das células a baixas temperaturas facilitaria as práticas de reprodução

artificial em animais e permitiria a criação de bancos de esperma de soldados que lutavam em guerras. Ao longo dos anos, os cientistas descobriram e aperfeiçoaram técnicas para manter as células em baixas temperaturas. Em 1949, Christopher Polge, Audrey Smith e Alan Parkes descreveram pela primeira vez o glicerol como um crioprotetor (POLGE et al., 1949). A descoberta do glicerol como crioprotetor é o início de uma nova era da criobiologia porque seu uso permitiu o desenvolvimento de protocolos de criopreservação de espermatozoides para diversas espécies (SZTEIN et al., 2018). O primeiro trabalho publicado mostrando o sucesso da criopreservação de esperma de peixe foi realizado por Blaxter em 1953. Após este estudo, nas últimas décadas, as metodologias de criopreservação de esperma de peixe evoluíram, aumentando o número de protocolos e suas aplicações (HORVÁTH & URBÁNYI, 2020).

### 2.1.3. Recipientes

O primeiro passo para obter sucesso em um protocolo de criopreservação é escolher o recipiente correto para armazenar as amostras de sêmen em baixas temperaturas. A composição, a espessura e principalmente o volume de sêmen que o recipiente contém influenciam diretamente nas curvas de congelamento e descongelamento da amostra e na finalidade de utilização das amostras (CABRITA et al., 2022).

Nos primórdios da criopreservação, tubos de vidro eram usados para criopreservar sêmen de peixe. Com o passar dos anos, recipientes plásticos: palhetas (0,25, 0,3, 0,5, 1,2, 2 e 5 mL) e criotubos (1, 1,8, 2, 3,5, 4,5 e 5 mL) substituíram os tubos de vidro (Figura 1).



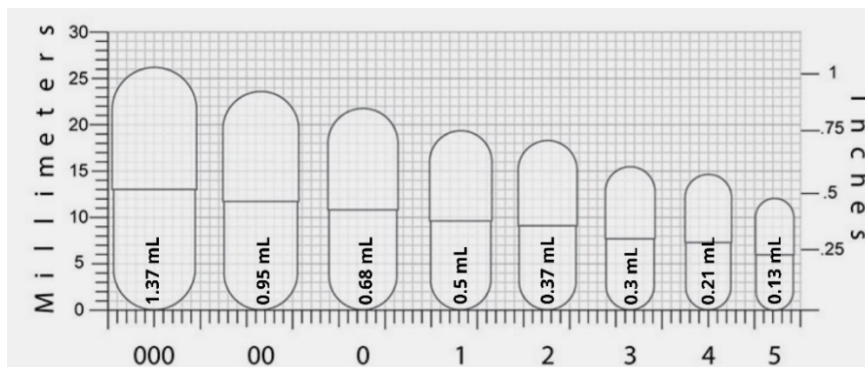
**Figura 1** – Recipientes plásticos usados para a criopreservação de sêmen de peixes, palhetas (a – 0,25; b – 0,5 mL) e criotubos (c – 1,8; d – 3,5; e – 4,5 mL). Fonte: acervo do autor.

Todos esses recipientes são fabricados com compostos plásticos ultra resistentes, como polipropileno e policloreto de vinil (PVC). A maioria dos protocolos de criopreservação de sêmen de peixes utilizam palhetas de baixo volume (0,25 e 0,5 mL). Esses recipientes são fáceis de manusear e, devido ao seu formato, são muito eficientes para armazenar amostras de sêmen em tanques de nitrogênio líquido. Porém, o baixo volume das palhetas (0,25 e 0,5 mL) é uma desvantagem quando é necessária grande quantidade de células, tornando a operação mais difícil e lenta.

Os criotubos são usados para criopreservar espermatozoides em volumes maiores do que aqueles suportados pelas palhetas (CABRITA et al., 2001). Estes recipientes são também utilizados em protocolos de criopreservação de células germinativas e tecidos reprodutivos (CABRITA et al., 2022). Os criotubos são resistentes, facilmente rotulados e armazenam um grande volume de células. Por outro lado, requerem um tanque específico de nitrogênio líquido para armazenar as amostras de forma ordenada e segura. Além disso, os criotubos de plástico são fabricados por poucas empresas, o que dificulta a sua acessibilidade nos países em desenvolvimento.

Cápsulas rígidas de gelatina e as cápsulas rígidas hipromelose (hidroxi-propil-metil-celulose – HPMC), são amplamente utilizadas para administração de medicamentos e outras substâncias. Recentemente foi observado que as cápsulas rígidas podem ser utilizadas como recipientes para criopreservação de espermatozoides (FRANÇA et al. 2023). As principais vantagens da utilização de cápsulas como recipientes na criopreservação incluem a resistência física a temperaturas ultrabaixas, identificação segura, biodegradabilidade, diferentes tamanhos (Figura 2), baixo custo de aquisição e alta acessibilidade no mercado. Porém, as cápsulas biodegradáveis também apresentam desvantagens, como a dissolução em contato com crioprotetores permeáveis à temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C), a utilização de um diluente para descongelar a amostra e a falta de equipamentos específicos para armazenamento em nitrogênio líquido. O desenvolvimento de protocolos de criopreservação celular utilizando cápsulas biodegradáveis ainda está no início. Assim, as desvantagens devem ser mitigadas com avanços protocolares.





**Figura 2** – Tamanhos, comprimento (mm e polegadas) e volume das cápsulas rígidas. A espessura da parede das cápsulas de acordo com o tamanho são: 0,11 mm (000); 0,107 mm (00); 0,104 mm (0); 0,102 mm (1); 0,99 mm (2); 0,091 mm (3); 0,089 mm (4) e 0,086 mm (5). Figura adaptada de icapsulepack.com.

Recipientes de baixo volume são uma excelente opção para formação de bancos de germoplasma e para produção comercial de larvas. Porém, para a produção comercial de larvas em larga escala, recipientes com volumes maiores facilitam o manuseio durante a reprodução animal (CABRITA et al., 2001; HERRANZ-JUSDADO et al., 2019a; MARIA et al., 2015).

#### 2.1.4. Diluidores

Os espermatozoides da maioria dos peixes permanecem imóveis dentro das gônadas, pelo contato com o plasma seminal (MORISAWA & SUZUKI, 1980). A ativação dos espermatozoides ocorre quando as células entram em contato com uma solução hiposmótica em relação ao plasma seminal no caso de espécies de água doce ou com uma solução hiperosmótica em espécies marinhas. Assim, diluidores com osmolalidade, pH e concentração iônica ajustados de acordo com a composição do plasma seminal mantêm os espermatozoides imóveis, permitindo a aplicação de diversas técnicas, incluindo a criopreservação de sêmen (ALAVI & COSSON, 2006).

A diluição do sêmen de peixe em um diluidor é essencial para o sucesso da criopreservação dos espermatozoides. A utilização do diluidor na solução crioprotetora visa manter a integridade da estrutura espermática durante o processo de congelamento e descongelamento. Sua principal função é manter a pressão osmótica e o pH dos espermatozoides, além de fornecer nutrientes e energia para as células (YONGSHENG et al., 2020). Devido às diferentes composições do fluido seminal e à fisiologia das espécies, a composição do plasma seminal também é diferente, tornando o uso do diluidor espécie-específico. O diluidor pode ser composto por apenas uma substância, como o utilizado no protocolo de criopreservação do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*), onde

somente é usado a frutose (ADAMES et al., 2015). Ou pode ser composto por mais de uma substância, como no extensor P1, composto por NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> e KCl), utilizado no protocolo de criopreservação de sêmen da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) (PEÑARANDA et al., 2009).

Os diluidores podem ser compostos por sais como NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, entre outros. Esses compostos químicos visam fornecer pressão osmótica e presença iônica para imobilizar os espermatozoides e manter o pH intracelular durante o processo de criopreservação. Eles também podem conter açúcares como glicose, sacarose, frutose, lactose e trealose. Os açúcares mantêm a pressão osmótica e atuam como crioprotetor extracelular, fornecendo energia aos espermatozoides (JAWAHAR & BETSY, 2020).

### **2.1.5. Crioprotetores**

Assim como os diluidores, os crioprotetores são essenciais para o sucesso da criopreservação de sêmen de peixe. O diluidor e o crioprotetor formam a solução crioprotetora. Os crioprotetores são divididos em dois grupos: permeáveis e não permeáveis. Ambos os grupos têm o mesmo objetivo: proteger a célula contra a formação de cristais de gelo. Uma solução crioprotetora pode conter apenas crioprotetores permeáveis ou não permeáveis. Porém, o mais comum nos protocolos de criopreservação de sêmen de peixes é a presença de ambos.

Os crioprotetores permeáveis são substâncias com alta solubilidade e baixo peso molecular capazes de penetrar nas células e exercer sua ação crioprotetora em todo o citoplasma e organelas (FAHY, 2010). Essas substâncias substituem a água existente no ambiente celular e aumentam a permeabilidade da membrana plasmática. Essas ações provocam desidratação parcial da célula, reduzindo o ponto de congelamento, o que consequentemente evita a formação de cristais de gelo no interior das células. Nos protocolos de criopreservação de sêmen de peixes, a escolha e concentração dos crioprotetores permeáveis, a temperatura de adição dos crioprotetores e o tempo de equilíbrio devem ser praticados de forma assertiva. Desta forma, a solução crioprotetora não será tóxica para as células e promoverá uma proteção eficiente durante a criopreservação (CABRITA et al., 2022). Dois dos crioprotetores permeáveis mais comumente usados em protocolos de criopreservação de sêmen de peixes são o dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO) e o metanol (MeOH).

Os crioprotetores não permeáveis são substâncias de alto peso molecular. Portanto, não conseguem penetrar no interior da célula, por isso promovem sua ação protetora externamente. Por serem compostos hidrofílicos, ligam-se às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução e reduzindo a formação de cristais de gelo (FAHY, 2007). Os crioprotetores não permeáveis utilizados nos protocolos de criopreservação de sêmen de peixes podem ser açúcares, como glicose, frutose e trealose, e fontes ricas em nutrientes, como gema de ovo e leite em pó.

### **2.1.6. Congelamento e descongelamento**

A maior parte dos danos celulares ocorre durante o congelamento e descongelamento das células. Portanto, esses dois momentos são considerados pontos críticos no processo de criopreservação, e sua execução deve ser bem estudada e planejada (MAZUR, 1984). O congelamento de sêmen de peixes geralmente é realizado com vapor de nitrogênio líquido. O congelamento do sêmen pode ser realizado de duas maneiras: uma forma não controlada e uma forma controlada. Na forma não controlada, o sêmen é criopreservado dentro de uma caixa de isopor preenchida com nitrogênio líquido. As amostras são colocadas em uma estrutura flutuante a uma certa altura da superfície do nitrogênio líquido, onde ficam em contato com o vapor de nitrogênio. As amostras são expostas ao vapor de nitrogênio líquido por um tempo ideal, normalmente alguns minutos, e são então submersas em nitrogênio líquido antes de serem armazenadas. Outra forma de realizar o congelamento descontrolado é utilizando um dry-shipper, um tanque de vapor de nitrogênio líquido para transportar amostras criopreservadas. Este método é amplamente utilizado em protocolos de criopreservação de sêmen de peixes sul-americanos (VIVEIROS & GODINHO, 2009) e é mais eficiente que a caixa de isopor para congelar um grande número de amostras (HOROKHOVATSKYI et al., 2017).

O congelamento de sêmen de forma controlada é realizado por meio de um equipamento denominado biofreezer. Este equipamento é composto por uma câmara de congelamento onde são colocadas as amostras, conectada a um computador, e a um tanque de nitrogênio líquido. Esse equipamento possui variações, como o freezer elétrico, que não utiliza vapor de nitrogênio líquido (DIOGO et al., 2018). Porém, o funcionamento deste equipamento segue o mesmo padrão. A curva de congelamento desejada é inserida em um software instalado no computador que controla a temperatura interna da câmara de congelamento e realiza a curva de congelamento com precisão. O congelamento de amostras de sêmen de peixes em biofreezers proporciona melhor padronização de

protocolos em comparação com métodos de congelamento não controlados. Os custos de aquisição e manutenção e a dificuldade de transporte fazem com que os métodos de congelamento não controlado ainda sejam os mais utilizados.

As amostras devem ser descongeladas para restaurar o metabolismo espermático e avaliar os resultados do processo de criopreservação. O descongelamento do sêmen de peixes é normalmente realizado em banho-maria. A temperatura da água e o tempo de submersão variam de acordo com o protocolo de cada espécie e o tipo de recipiente utilizado para armazenar as amostras. A premissa normalmente é que quanto maior o volume de sêmen congelado, maior será a temperatura e o tempo de submersão das amostras. As temperaturas da água de descongelamento podem variar de 5 a 80 °C. O tempo de descongelamento para palhetas (0,25-0,5 mL) pode variar entre 3 a 60 s, enquanto para criotubos e macrotubos podem ser superiores a 150 s (CABRITA et al., 2001; HERRANZ-JUSDADO et al., 2019a; RIESCO et al., 2017).

### **2.1.7. Aplicação**

Atualmente, o principal uso da técnica de criopreservação de sêmen de peixes é em programas de conservação de material genético por meio de bancos de germoplasma, mantidos principalmente por financiamento público (ASTURIANO et al., 2017). Os bancos de germoplasma contêm amostras de espécies de peixes de água doce e salgada utilizadas como modelos experimentais em laboratório. Essas amostras podem auxiliar a aquicultura, simplificando o manejo dos reprodutores nas propriedades e servindo como backup genético (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017). Os criobancos também são uma ferramenta poderosa para preservar o material genético de peixes selvagens e podem auxiliar os programas de conservação ambiental na reestruturação dos estoques naturais de espécies com alto risco de extinção. Além disso, os bancos de germoplasma permitem a conservação de peixes mutantes ou transgênicos de espécies utilizadas como modelos experimentais em pesquisas biomédicas (LIU et al., 2019).

Na aquicultura, a criopreservação de sêmen proporciona o melhor aproveitamento dos criadores nas propriedades produtoras de alevinos, permitindo flexibilizar o período de reprodução, conservando a genética dos animais selecionados por programas de melhoramento genético e solucionando problemas de dessincronização entre machos e fêmeas na maturação final dos gametas (ASTURIANO et al., 2017). Além disso, a criopreservação facilita a produção de híbridos (JUDYCKA et al., 2019). A criopreservação de sêmen de peixes traz benefícios para a aquicultura; no entanto,

apresenta desafios para a sua implementação. Entre esses desafios estão a padronização de metodologias de criopreservação de sêmen para cada espécie e o desenvolvimento de protocolos práticos que escalam o congelamento e descongelamento de amostras a serem utilizadas na fertilização de oócitos (JUDYCKA et al., 2019; TIERSCH, 2011). Devido a esses desafios, a criopreservação de sêmen ainda é pouco utilizada na aquicultura em comparação com o seu uso na reprodução de bovinos e equinos. Por outro lado, a aquicultura é uma atividade que tem apresentado uma evolução constante, não só produtiva, mas também tecnologicamente. De olho nesse mercado, grandes empresas de reprodução animal já oferecem linhas de produtos para criopreservação de sêmen de peixes. Além disso, a tendência é que surjam novas empresas que ofereçam serviços de criopreservação de sêmen de peixes e invistam no desenvolvimento de produtos voltados para essa área (ASTURIANO et al., 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017).

## 2.2 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá *Rhamdia quelen* (Figura 3) é um peixe teleósteo pertencente à ordem Siluriformes e faz parte da família Pimelodidae. Esta espécie tem distribuição neotropical da Argentina e Uruguai ao sudeste do México. No Brasil esse peixe é conhecido como “jundiá cinza”. Os peixes adultos têm hábito alimentar onívoro se alimentam na natureza de crustáceos, insetos, peixes, restos de plantas e restos orgânicos (SILFVERGRIP, 1996).



**Figura 3** – Jundiá cinza *Rhamdia quelen*. Fonte: Laboratório AQUAM.

A taxa de crescimento dos machos é superior à das fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se inverte. O crescimento assintótico calculado dos machos é de 52 cm e das fêmeas de 66,5 cm (GOMES et al., 2000). O jundiá é um peixe reofílico e ovíparo com fecundação externa. De acordo com Nakatani et al. (2001) a maturação sexual é atingida com aproximadamente 16,5 cm nas fêmeas e 13,4 cm nos machos. Esta espécie apresenta dois picos reprodutivos por ano, um na primavera e outro no verão, com

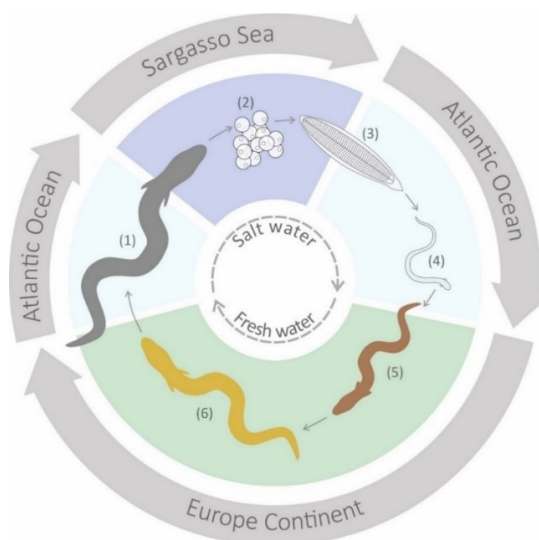
desova total. Não há cuidado parental. Reproduzem-se em áreas com águas limpas e calmas com fundo pedregoso.

Ao longo dos anos, o jundiá tem sido utilizado como uma espécie nativa modelo para o desenvolvimento de metodologias em diversas áreas da aquicultura, como reprodução (ADAMES et al., 2015; NEUMANN et al., 2019), criobiologia (COSTA et al., 2019; NEUMANN et al., 2019), manejo (BECKER et al., 2013; CORSO et al., 2019) e sanidade (ANDRADE et al., 2006). Isso se deveu ao fato de a espécie apresentar características desejáveis, como a grande quantidade de gametas produzidos durante o período reprodutivo e o temperamento calmo dos animais.

### 2.3 Enguia europeia (*Anguilla anguilla*)

A família das enguias constitui um grupo diversificado de Anguilliformes, abrangendo mais de 800 espécies conhecidas de enguias (MAPES & MOUILLOT, 2022). O gênero *Anguilla* compreende 19 espécies de enguias de água doce (WATANABE, 2003). Estas espécies têm um ciclo de vida catádromo envolvendo migrações reprodutivas oceânicas de algumas centenas a vários milhares de quilômetros, dependendo da espécie (ARAI, 2014).

Entre as espécies do gênero *Anguilla*, a enguia europeia *A. anguilla* é a que realiza a migração reprodutiva mais distante. Esta espécie viaja de 4.000 a 6.000 km entre os mares que banham o continente europeu e o Mar dos Sargaços ao longo do Oceano Atlântico (ARAI, 2014). A ciclo de vida da enguia europeia (Figura 4) começa com a saída de animais reprodutores maduros dos rios continentais até ao Mar dos Sargaços, aproveitando as correntes Canárias e Norte-equatorial. Os animais chegam após 6 a 7 meses, reproduzem-se e morrem. As larvas, chamadas de *Leptocephalus*, regressam à costa europeia ajudadas pela Corrente do Golfo e pela deriva do Atlântico Norte durante 8-9 meses (ARAI et al., 2000). Chegando ao litoral, sofrem metamorfose e se transformam em enguias de vidro, depois entram nos rios onde crescem até atingirem a puberdade anos depois (mais ou menos, dependendo da temperatura da região) (TESCH, 2003).



**Figura 4** - Ciclo de vida catádromo da enguia europeia *Anguilla anguilla*. Os reprodutores realizam (1) migração reprodutiva dos rios continentais europeus para o Mar dos Sargãos, cruzando o Oceano Atlântico. A reprodução (2) ocorre no Mar dos Sargãos e, após a eclosão, as larvas leptocéfalo (3) são transportadas para o continente europeu pelas correntes do Oceano Atlântico. Chegando ao litoral do continente europeu, sofrem metamorfose e se transformam em enguias de vidro (4). Em seguida, entram nos rios continentais e continuam crescendo, passando pelas fases marrom (5) e amarela (6) até atingirem a fase de migração reprodutiva (1). Adaptado de (WILLIAMSON et al., 2023).

Ao longo dos anos, ações humanas como a pesca excessiva, a poluição e a construção de barragens, entre outras, reduziram 90% dos estoques naturais da espécie. Hoje em dia, a enguia europeia (Figura 5) está classificada como “ criticamente Ameaçada” na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (PIKE et al., 2020). A alta demanda do mercado consumidor e o risco de extinção da espécie no ambiente natural levaram a uma mobilização significativa dos governos e da comunidade científica para buscar mitigar o problema. Assim, são financiados projetos de conservação de espécies e de desenvolvimento e melhoria de técnicas que aumentem a produção europeia de enguias na aquicultura.



**Figura 5** - Enguia europeia *Anguilla anguilla* (Fonte: Carta Piscícola Española; <https://www.cartapiscicola.es>).

A criopreservação de sêmen é uma técnica capaz de auxiliar a conservação e produção natural da enguia europeia em cativeiro. Portanto, protocolos de conservação de curto e longo prazo foram criados e aprimorados nas últimas duas décadas (revisado por HERRANZ-JUSDADO et al., 2019b). Os protocolos estabelecidos são eficientes,

mas novos ajustes podem ser feitos para aumentar a sustentabilidade econômica e ambiental do processo de criopreservação.

#### 2.4 Dourada (*Sparus aurata*)

A dourada *Sparus aurata* (Figura 6) pertence à superclasse Actinopterygii, à classe Osteichthyes e à ordem Perciformes (HANEL & COSTAS, 2011). A espécie é classificada como peixe subtropical e seus estoques naturais estão distribuídos na região que vai de 15° a 62° N e de 7° W a 43° E. Esta região abrange o Oceano Atlântico Oriental e os Mares Mediterrâneo e Negro. Em ambiente natural, os peixes habitam a zona de arrebentação em profundidades que variam de 30 a 150 m. Os animais vivem em pequenos cardumes ou solitários, possuem características euritérmicas e eurialinas e são resistentes a ampla variação de temperaturas e salinidades (HANEL & COSTAS, 2011). A dourada tem hábito alimentar onívoro, adaptando a sua dieta de acordo com a disponibilidade de alimentos no seu habitat. Suas preferências alimentares são gastrópodes e bivalves, mas também se alimentam de equinodermos, poliquetas e, ocasionalmente, algas e briozoários (PITA et al., 2002).



**Figura 6** - Dourada *Sparus aurata*. (Fonte: Scandinavian Fishing Year Book; [https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/sparus-aurata\\_en](https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/sparus-aurata_en)).

A dourada é uma espécie de peixe que apresenta hermafroditismo protândrico. Nos primeiros dois anos, os peixes crescem e amadurecem como machos; quando atingem 30 cm de comprimento, fazem a transição para fêmeas (CHAOUÏ et al., 2006). Durante o período masculino os testículos localizam-se na região ventral e apresentam espermatogênese assíncrona, na parte dorsal a gônada apresenta uma área ovariana não funcional (ZOHAR et al., 1978). Considerando a semelhança genética entre machos e fêmeas, as disparidades morfológicas e comportamentais e os dimorfismos sexuais são atribuídas a uma expressão diferente de genes de acordo com o sexo, resultando em uma transcrição mais ou menos pronunciada em um sexo em relação ao outro (PAULETTO et al., 2018).

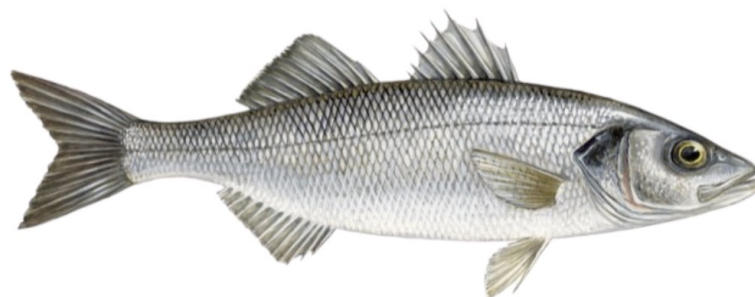


A reprodução da espécie pode ser realizada em cativeiro. A manipulação da temperatura da água e do fotoperíodo ambiental induz a maturação sexual dos peixes (FAO, 2022b). Formam-se grupos de animais de diferentes idades, seguindo a proporção de 2 machos para cada fêmea. A liberação do sêmen ocorre naturalmente ou por extração. A desova pode ocorrer espontânea ou ser induzida com auxílio do hormônio GnRH $\alpha$  em doses que variam de 5 a 20 mg/kg (FAO, 2022b).

A dourada é o quarto peixe marinho mais produzido no mundo (FAO, 2023a). A troca de conhecimento entre piscicultores e cientistas levou ao crescimento da produção ao longo dos anos. Várias áreas de produção da espécie foram investigadas nas últimas décadas (MHALHEL et al., 2023), sendo uma delas a criopreservação do esperma da espécie (CABRITA et al., 2005; FABBROCINI et al., 2000; GALLEGO et al., 2012). Ajustes na gestão da produção serão sempre bem-vindos para o crescimento sustentável contínuo da aquicultura.

### 2.5 Robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*)

O robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (Figura 7) pertence à superclasse Actinopterygii, classe Osteichthyes, ordem Perciformes e família Moronidae. Os estoques naturais da espécie estão distribuídos no Oceano Atlântico Oriental, Mares Azov, Negro, Norte, Báltico, Mediterrâneo e Adriático (11°- 72° Norte e 19° Oeste - 42° Leste). A espécie é considerada euritérmica, eurialina e resistente às variações de temperatura e salinidade. Portanto, são encontrados em baías abrigadas, lagoas costeiras, estuários e áreas offshore (LÓPEZ et al., 2015). O robalo europeu tem hábito alimentar carnívoro e se alimenta de camarões, moluscos e outros peixes (ABBATE et al., 2012).



**Figura 7** - Robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (Fonte: Scandinavian Fishing Year Book; [https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/sparus-aurata\\_en](https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/sparus-aurata_en)).

Esta espécie é uma espécie gonocorística sem caracteres sexuais secundários morfológicos. No entanto, apresenta padrões de crescimento distintos relacionados ao sexo, com as fêmeas crescendo mais rapidamente e atingindo tamanhos maiores que os machos (SAILLANT et al., 2001). A idade e o tamanho em que os animais atingem a maturidade sexual variam dependendo do ambiente (LÓPEZ et al., 2015). No Mediterrâneo, os machos reproduzem-se aos dois anos e com 20-25 cm de comprimento. As fêmeas desovam pela primeira vez entre os 3 e os 4 anos de idade e têm 29-34,5 cm de comprimento (LÓPEZ et al., 2015).

O robalo europeu é o sexto peixe marinho mais produzido no mundo (FAO, 2023b). Desenvolver a cadeia produtiva foi fundamental para colocar essa espécie entre as mais produzidas. Entre as áreas de produção está a reprodução em cativeiro. Segundo Superio et al. (2021), a fertilização *in vitro* através da indução hormonal dos criadores é a forma mais eficiente de desenvolver programas de melhoramento e, conseqüentemente, a produção da espécie. Assim, uma das ferramentas para facilitar a troca de material genético entre piscicultores e criar um banco de apoio genético para programas de melhoramento genético é a criopreservação de esperma. Protocolos para a criopreservação de esperma de robalo europeu foram estabelecidos e melhorados ao longo dos anos (FAUVEL et al., 1998; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012, 2013). Porém, a busca por tornar a técnica mais eficiente do ponto de vista da sustentabilidade ambiental será sempre bem-vinda.

### **3. PROJETOS, BOLSAS E EMPRESAS ENVOLVIDAS NESTA TESE**

Esta tese foi parcialmente financiada pelo MCIN com financiamento da União Europeia NextGenerationEU 510 (PRTR-C17.I1), Generalitat Valenciana através dos projetos THINKINAZUL/2021/012, THINKINAZUL/2021/024 e THINKINAZUL/2021/042. Os experimentos de tese também receberam financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Nº 17/2551-0000917-7) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX - 88882.346090/2015-1). O autor recebeu bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (141717/2019-0 e 200285/2021-1).

A colaboração com o Prof. Eduardo Antônio Sanches e seu grupo de pesquisa, Pesquisa em Reprodução de Peixes, sediado na Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Registro, São Paulo, Brasil. A colaboração com o Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

e seu grupo de pesquisa, Laboratório de Bioética da Reprodução, sediado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. O grupo de pesquisa Laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal coordenado pelo Prof. Ivan Cunha Bustamante-Filho na Universidade UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil foi fundamental. Alicia Felip, Ana Gómez e Jaume Pérez Sánchez e seu pessoal do Instituto de Aquicultura de Torre de la Sal (IATS, CSIC), em Ribera de Cabanes (Castellón, Espanha) também foram essenciais. para obter e proceder à avaliação das amostras.

## 4. HIPÓTESES E OBJETIVOS

### 4.1 Hipóteses

Hipótese 1: A técnica de diluição do sêmen descongelado de jundiá *Rhamdia quelen* aumenta a qualidade cinética dos espermatozoides e sua capacidade reprodutiva.

Hipótese 2: As cápsulas rígidas de gelatina e as cápsulas rígidas de hipromelose podem ser utilizadas como um recipiente no processo de criopreservação de sêmen de espécies de peixes de água doce e marinhos.

Hipótese 3: As cápsulas rígidas de gelatina e as cápsulas rígidas de podem ser utilizadas como um recipiente alternativo ao uso das palhetas plásticas para criopreservas amostras de sêmen de peixes.

### 4.2 Objetivos

#### 4.2.1. Geral

Estudar, criar, adaptar e testar metodologias de baixo custo que potencializem o aproveitamento do sêmen de peixes e tornem o processo de criopreservação de sêmen mais ecologicamente correto.

#### 4.2.2. Específicos

- Avaliar a qualidade e capacidade reprodutiva de sêmen criopreservado de jundiá diluído após descongelamento em um diluidor.
- Desenvolver e padronizar protocolos de criopreservação de sêmen de jundiá, enguia europeia, dourada e robalo europeu, usando cápsula rígida biodegradável de gelatina e cápsula rígida biodegradável de hipromelose (HPMC) de baixo custo.
- Comparar a qualidade espermática de amostras de sêmen de jundiá, enguia europeia, dourada e robalo europeu criopreservadas em palhetas e cápsulas rígidas biodegradáveis

## CAPÍTULO II

### **Post-thaw dilution of *Rhamdia quelen* sperm improves the reproductive success**

T. S. França<sup>1</sup>, I. C. Gomes<sup>1</sup>, E. A. Sanches<sup>2</sup>, M. Pérez-Atehortúa<sup>3</sup>, N. S. Teixeira<sup>1</sup>, R. B. Rodrigues<sup>1</sup>, T. R. Freitas<sup>1</sup>, A. G. Galuppo<sup>1</sup>, M. Quirino<sup>4</sup>, J. L. Benato<sup>1</sup>, T. L. F. Machado<sup>1</sup>, L. S. Marques<sup>1</sup>, I. C. Bustamante-Filho<sup>5</sup>, F. P. Bortolozzo<sup>4</sup>, D. P. Streit Jr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aquam Research Group, Animal Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91540-000,

Brazil

<sup>2</sup>Fishery Engineering Course and Aquaculture Centre (CAUNESP) São Paulo State University, Registro, São Paulo 11900-000, Brazil

<sup>3</sup>Department of Agricultural and Aquacultural Sciences, Faculty of Natural Resources, Catholic University of Temuco, Temuco 4781312, Chile

<sup>4</sup>Dept. Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91540-000, Brazil

<sup>5</sup>Biotechnology Laboratory, University of Vale of Taquari - Univates, Avelio Tallini Street, 171, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil

*Animal Reproduction Science* 2022, 243, 107018

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107018>

### CAPÍTULO III

#### **Fish sperm cryopreservation using biodegradable containers: New low-cost and environment-friendly methodology**

Thales de Souza França<sup>1</sup>, Itamar Cossina Gomes<sup>1</sup>, Eduardo Antônio Sanches<sup>2</sup>, Maritza Pérez Atehortúa<sup>3</sup>, Nathalia Santos Teixeira<sup>4</sup>, Rômulo Batista Rodrigues<sup>1</sup>, Thaiza Rodrigues de Freitas<sup>1</sup>, Jhony Lisbôa Benato<sup>1</sup>, Lis Santos Marques<sup>4</sup>, Ana Regina Seabra de Souza<sup>2</sup>, Danilo Pedro Streit Jr<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup>Aquam Research Group, Animal Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil.

<sup>2</sup>Fishery Engineering Course and Aquaculture Centre (CAUNESP) São Paulo State University, Registro, São Paulo 11900-000, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Agricultural and Aquacultural Sciences, Faculty of Natural Resources, Catholic University of Temuco, Temuco, 4781312, Chile

<sup>4</sup>Postgraduate Program in Veterinary Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil.

*Reproduction 2023, 166, 89-97*

<https://doi.org/10.1530/REP-23-0046>

## CAPÍTULO IV

### **Successful cryopreservation in biodegradable containers of sperm from aquaculture Mediterranean fishes**

T.S. França <sup>1,2</sup>, W.A. González-López <sup>1</sup>, M.P. Sanchez <sup>1,3</sup>, L. Ferrão <sup>a</sup>, F. Fernández-García <sup>1</sup>, L.P. Borges <sup>1,3</sup>, A. Belenguer <sup>4</sup>, P.G. Holhorea <sup>4</sup>, J.C. Calduch-Giner <sup>4</sup>, A. Felipe <sup>4</sup>, A. Gómez <sup>4</sup>, J. Pérez-Sánchez <sup>4</sup>, D.P. Streit Jr <sup>2</sup>, J.F. Asturiano <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Acuicultura y Biodiversidad. Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Aquam Research Group, Animal Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil.

<sup>3</sup>Neotropical Ichthyology Laboratory LINEO Group, Department of Biology and Animal Science, São Paulo State University UNESP– Univ. Estadual Paulista, Avenida Brasil Centro, 56, Ilha Solteira, Sao Paulo 15385-000, Brazil

<sup>4</sup>Institute of Aquaculture Torre de la Sal (IATS, CSIC), Ribera de Cabanes, Castellón, Spain.

*Theriogenology* (2023), 216, 53-61.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.016>

## **CAPITULO V**



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos capítulos apresentados nesta tese, o objetivo foi desenvolver metodologias de baixo custo para otimizar o uso do sêmen e tornar o processo de criopreservação de sêmen de peixes mais ambientalmente sustentável. Os achados desta tese podem facilitar e aumentar a produção de larvas em cativeiro utilizando espermatozoides pós-descongelamento utilizando protocolos de criopreservação que geram menos poluentes no ambiente. Entre as realizações mais relevantes desta tese destacam-se:

i. A diluição pós-descongelamento do sêmen de jundiá foi bem-sucedida. Com a técnica utilizada, as amostras diluídas pós-descongelamento apresentaram aumento de 32% na velocidade curvilínea, 30% na progressão espermática, 29% na taxa de fertilização e 28% na taxa de eclosão comparadas com amostras não diluídas.

ii. Os protocolos de criopreservação foram desenvolvidos para criopreservação de sêmen de quatro espécies de peixes utilizando cápsulas de gelatina biodegradáveis e cápsulas de HPMC biodegradáveis como recipientes. Foi depositada uma patente (BR 10 2022 017817) para a metodologia desenvolvida.

iii. Observamos que as cápsulas rígidas de gelatina e as cápsulas rígidas de hipromelose foram tão eficientes quanto canudos plásticos no armazenamento de espermatozoides de quatro espécies de peixes durante a criopreservação. Assim, os resultados observados comprovam que as cápsulas são uma alternativa a este recipiente comumente utilizado

## REFERÊNCIAS

- ABBATE, F. *et al.* Morphology of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tongue. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, n. 5, p. 643–649, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.21105>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- ADAMES, M. S. *et al.* Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 161, p. 119–128, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, Chichester, v. 30, n. 1, p. 1–14, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004>. Acesso em: 12 dez. 2023.
- AL-TABAKHA, M. M. HPMC capsules: current status and future. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 13, n. 3, p. 428–442, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18433/j3k881>. Acesso em: 20 dez. 2023.
- ALVARENGA, M. A. *et al.* Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 32, n. 8, p. 424–429, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.003>. Acesso em: 11 nov. 2023.
- ANDRADE, L. S. *et al.* Survival and behavior of silver catfish, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 1004–1007, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1059/S0103-84782006000300047>. Acesso em: 21 dez. 2023.
- ARAI, T.; OTAKE, T.; TSUKAMOTO, K. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. **Marine Biology**, Berlin, v. 137, p. 39–45, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s002270000326>. Acesso em: 18 nov. 2023.
- ARAI, T. Evidence of local short-distance spawning migration of tropical freshwater eels, and implications for the evolution of freshwater eel migration. **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 4, n. 19, p. 3812–3819, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.1245>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVÁTH, A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, Orlando, v. 245, p. 69–76, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>. Acesso em: 29 nov. 2023.
- BECKER, A. G. *et al.* Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 11, n. 3, p. 675–681, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252013000300021>. Acesso em: 16 dez. 2023.

CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3/4, p. 301–314, 2001. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00636-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00636-6). Acesso em: 03 jan. 2024.

CABRITA, E. *et al.* Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 144–153, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.12.003>. Acesso em: 15 dez. 2023.

CABRITA, E. *et al.* Technologies and strategies for ex situ conservation of aquatic organisms: the role of cryopreservation in long-term management. In: FERNÁNDEZ MONZÓN, I.; FERNANDES, J. (ed.). **Cellular and molecular approaches in fish biology**. London: Elsevier, 2022. p. 1–48. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-822273-7.00011-2>. Acesso em: 18 dez. 2023.

CHAOUÏ, L. *et al.* Growth and reproduction of the gilthead seabream *sparus aurata* in Mellah lagoon. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 70, n. 3, p. 545–552, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.2006.70n3545>. Acesso em: 21 dez. 2023.

CORSO, M. N. *et al.* Effects of different doses of eugenol on plasma cortisol levels and the quality of fresh and frozen-thawed sperm in South American catfish (*Rhamdia quelen*). **Theriogenology**, New York, v. 125, p. 135–139, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.033>. Acesso em: 05 jan. 2024.

COSTA, B. B. *et al.* Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 987–993, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jai.13928>. Acesso em: 19 dez. 2023.

DIOGO, P. *et al.* Electric ultrafreezer (– 150 °C) as an alternative for zebrafish sperm cryopreservation and storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 44, n. 6, p. 1443–1455, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-018-0500-6>. Acesso em: 16 dez. 2023.

FABBROCINI, A. *et al.* Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 46–53, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1999.2220>. Acesso em: 27 dez. 2023.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. S45–S53, 2010. Suplemento. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>. Acesso em: 15 nov. 2023.

FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709–714, 2007. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60672-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60672-4). Acesso em: 15 nov. 2023.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 2022: towards blue**

transformation. Rome: FAO, 2022a. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.4060/cc0461en>. Acesso em: 06 jan. 2024.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. ***Sparus aurata* cultured aquatic species information programme**. Rome: FAO, 2022b. Disponível em:  
[www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/sparus\\_aurata\\_es?lang=es](http://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/sparus_aurata_es?lang=es). Acesso em: 10 nov. 2023.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. ***Sparus aurata* Linnaeus, 1758**. Rome: FAO, 2023a. Disponível em:  
[www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2384/en](http://www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2384/en). Acesso em: 10 nov. 2023.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. ***Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758**. Rome: FAO, 2023b. Disponível em:  
[www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2291/en](http://www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2291/en). Acesso em: 10 nov. 2023.

FAUVEL, C. *et al.* Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 11, n. 6, p. 387–394, 1998. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)80004-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80004-7). Acesso em: 24 nov. 2023.

FRANÇA, T. S. *et al.* Fish sperm cryopreservation using biodegradable containers: New low-cost and environment-friendly methodology. **Reproduction**, Bristol, v. 166, p. 89-97, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1530/REP>. Acesso em: 25 nov. 2023.

GALLEGO, V. *et al.* Comparison of two techniques for the morphometry study on gilthead seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa and evaluation of changes induced by cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 77, n. 6, p. 1078–1087, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.010>. Acesso em: 30 nov. 2023.

GOMES, L. C. *et al.* Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782000000100029>. Acesso em: 28 dez. 2023.

HANEL, R.; COSTAS, S. T. Phylogeny, evolution, and taxonomy of sparids with some notes on their ecology and biology. *In*: PAVLIDIS, M.; MYLONAS, C. (ed.). **Sparidae: biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species**. New York: Wiley-Blackwell, 2011. p. 51-73. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1002/9781444392210.ch2>. Acesso em: 17 dez. 2023.

HERRANZ-JUSDADO, J. G. *et al.* European eel sperm storage: optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 506, p. 42–50, 2019a. Disponível em:  
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.019>. Acesso em: 18 dez. 2023.

- HERRANZ-JUSDADO, J. G. *et al.* Eel sperm cryopreservation: an overview. **Theriogenology**, New York, v. 133, p. 210–215, 2019b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.033>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- HOROKHOVATSKYI, Y. *et al.* Consequences of uncontrolled cooling during sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm cryopreservation on post-thaw motility and fertilizing ability. **Theriogenology**, New York, v. 95, p. 89–95, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.007>. Acesso em: 20 dez. 2023.
- HORVÁTH, A.; URBÁNYI, B. Sperm cryopreservation of aquatic species. *In*: YOSHIDA, M.; ASTURIANO, J. F. (ed.). **Reproduction in aquatic animals**. Singapore: Springer, 2020. p. 193-223. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-2290-1\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-2290-1_16). Acesso em: 29 dez. 2023.
- JAWAHAR, K. T. P.; BETSY, J. Cryopreservation of fish gametes: an overview. *In*: BETSY, J.; KUMAR, S. (ed.). **Cryopreservation of fish gametes**. Singapore: Springer, 2020. p. 151–175. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_7). Acesso em: 03 jan. 2024.
- JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. **Theriogenology**, New York, v. 132, p. 12–21, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.022>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- LING, W. C. Thermal degradation of gelatin as applied to processing of gel mass. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 67, n. 2, p. 218–223, 1978. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600670223>. Acesso em: 22 nov. 2023.
- LIU, Y. *et al.* Development of germplasm repositories to assist conservation of endangered fishes: examples from small-bodied livebearing fishes. **Theriogenology**, New York, v. 135, p. 138–151, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.020>. Acesso em: 04 dez. 2023.
- LÓPEZ, R. *et al.* What can exploratory modelling tell us about the ecobiology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a comprehensive overview. **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 28, n. 2/4, p. 61–79, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/alr/2015007>. Acesso em: 06 dez. 2023.
- MAPES, M.; MOUILLOT, E. Taxonomic challenges and advances in eel family classification: integrating multidisciplinary approaches. **Fishtaxa**, Tehran, v. 29, p. 24–35, 2022.
- MARIA, A. N. *et al.* Use of cryotubes for the cryopreservation of Tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 109–114, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.004>. Acesso em: 14 dez. 2023.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm.

- Theriogenology**, New York, v. 77, n. 6, p. 1129–1136, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 333–338, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.001>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 472, p. 156–177, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, New York, v. 168, p. 939-949, 1970.
- MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury evidence from chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 71, p. 345-355, 1972.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 16, p. 125–142, 1984.
- MHALHEL, K. *et al.* Review on gilthead seabream (*Sparus aurata*) aquaculture: life cycle, growth, aquaculture practices and challenges. **Journal of Marine Science and Engineering**, Basel, v. 11, n. 10, [art.] 2008, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jmse11102008>. Acesso em: 07 dez. 2023.
- MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, New York, v. 210, n. 4474, p. 1145–1147, 1980. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.7444445>. Acesso em: 08 dez. 2023.
- MURRAY, K. A.; GIBSON, M. I. Chemical approaches to cryopreservation. **Nature Reviews Chemistry**, London, v. 6, p. 579-593, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41570-022-00407-4>. Acesso em: 08 dez. 2023.
- NAKATANI, K. *et al.* **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e Manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.
- NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 201, p. 84–92, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.01.001>. Acesso em: 22 nov. 2023.
- PAULETTO, M. *et al.* Genomic analysis of *Sparus aurata* reveals the evolutionary dynamics of sex-biased genes in a sequential hermaphrodite fish. **Communications Biology**, London, v. 1, [art.] 119, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0122-7>. Acesso em: 27 nov. 2023.

- PEÑARANDA, D. S. *et al.* Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 119–126, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.06.001>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- PIKE, C.; CROOK, V.; GOLLOCK, M. *Anguilla anguilla*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, London, [art.] e.T60344A152845178, [p. 1-44], 2020. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T60344A152845178.en>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- PITA, C.; GAMITO, S.; ERZINI, K. Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the back seabream (*Spondyliosoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 18, n. 2, p. 81–86, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00336.x>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London v. 164, [art.] 666, 1949.
- RIESCO, M. F. *et al.* *Solea senegalensis* sperm cryopreservation: new insights on sperm quality. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 10, [art.] e0186542, [p. 1–19], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186542>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- RODRIGUES, R. B. *et al.* Oxidative stress and DNA damage of zebrafish sperm at different stages of the cryopreservation process. **Zebrafish**, Larchmont, v. 18, n. 2, p. 97–109, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1942>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- SAILLANT, Eric *et al.* Sexual growth dimorphism in sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 202, p. 371-387, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00786-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00786-4). Acesso em: 02 jan. 2024.
- SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockolm: Swedish Museum of Natural History, 1996.
- SPALLANZANI, L. **Opuscoli di fisica animale, e vegetabile dell Abate Spallanzani. Aggiuntevi alcune lettere relative ad essi opuscoli dal celebre signor Bonnet di Ginevra. E da altri scritte all'autore**. Modena: Societa Tipografica, 1776. Disponível em <https://wellcomecollection.org/works/zrjranu7/items?canvas=7>. Acesso em: 06 jan. 2024.
- SUPERIO, J. *et al.* Spawning kinetics and parentage contribution of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) broodstocks, and influence of GnRH $\alpha$ -induced spawning. **Aquaculture Reports**, Amsterdam, v. 21, [art.] 100766, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100766>. Acesso em: 09 jan. 2024.
- 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 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.008>. Acesso em: 12 dez. 2023.

TESCH, F. W. Developmental stages and distribution of the eel species. *In*: TESCH, F. W.; THORPE, J. E. (ed.). **The Eel**. Oxford: Blackwell Science, 2003. v. 1, p. 73–117. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470995389.ch3>. Acesso em: 12 dez. 2023.

TIERSCH, T. R. Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization. *In*: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2011. v. 1, p. 646–671.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, p. 137–150, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>. Acesso em: 05 dez. 2023.

WATANABE, S. Taxonomy of the freshwater eels, Genus *Anguilla* Schrank, 1798. *In*: AIDA, K.; TSUKAMOTO, K.; YAMAUCHI, K. (ed.). **Eel biology**. Tokyo: Springer, 2003. p. 3–18. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-4-431-65907-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-65907-5_1). Acesso em: 22 nov. 2023.

WILLIAMSON, Michael J. *et al.* Anguillid eels. **Current Biology**, London, v. 33, p. 879-897, 2023.

YANG, H.; HUO, Y. Review of molluscan larval cryopreservation and application to germplasm cryobanking and commercial seed production. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 547, [art.] 737491, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737491>. Acesso em: 4 jan. 2024.

YONGSHENG, T. *et al.* Cryopreservation of marine fish sperm. *In*: BETSY, J.; KUMAR, S. (ed.). **Cryopreservation of fish gametes**. Singapore: Springer, 2020. p. 187–210. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_9). Acesso em: 22 dez. 2023.

ZILHADIA, Z. *et al.* Evaluation and characterization of hard-shell capsules formulated by using goatskin gelatin. **Polymers**, Basel, v. 14, [art.] 4416, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym14204416>. Acesso em: 23 nov. 2023.



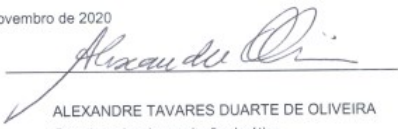
ZOHAR, Y.; ABRAHAM, M; GORDIN, H. The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* during the first two years of life. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, Paris, v. 18, n. 4, p. 877–882, 1978.



## APÊNDICES

### 1. APÊNDICE A

Cartas de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e da Universidade Estadual Paulista (UNESP) para o uso de machos e fêmeas de jundiá *Rhamdia quelen* nos experimentos.

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
<b>CARTA DE APROVAÇÃO</b>			
<b>Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:</b>			
<b>Número:</b> 39527			
<b>Título:</b> Sêmen de peixes criopreservado em cápsulas farmacêuticas			
<b>Vigência:</b> 01/08/2020 à 31/08/2023			
<b>Pesquisadores:</b>			
<b>Equipe UFRGS:</b>			
DANILO PEDRO STREIT JR - coordenador desde 01/08/2020			
Itamar Cossina Gomes - desde 01/08/2020			
Thales de Souza França - desde 01/08/2020			
<i>Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 26/10/2020 - via Webconferência - Mconf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de peixes Jundiá, 24 machos e 12 fêmeas, de 2 anos de idade, adquiridos da Piscicultura Nossa Senhora Aparecida (Ijuí - RS); peixes da espécie Zebrafish, 120 machos e 280 fêmeas, obtidos de uma loja Aquafauna Aquarismo (Porto Alegre - RS) e peixes Piracanjuba, 24 machos e 6 fêmeas, 2 anos de idade, da Piscicultura Panamá (Paulo Lopes, SC, Brasil), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.</i>			
Porto Alegre, Quinta-Feira, 5 de Novembro de 2020			
			
ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA Coordenador da comissão de ética			



Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
 Câmpus de Registro  
 CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Tecnologias aplicadas no sêmen de Jundiá *Rhamdia quelen* após o processo de criopreservação**", registrada com o nº 01/2021, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Câmpus de Registro da UNESP, em reunião de 20/03/2021.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03 a 01/04/2021
Espécie/linhagem/raça	Jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> )
Nº de animais	26 machos; 8 fêmeas; 34 animais
Peso/Idade	400 gramas
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	UNESP, Campus de Registro, Unidade Agrochã: BR-116, Km 449 - Registro/SP - CEP 11.900-000

Registro, 20 de março de 2021.

  
 Profa. Dra. Kelly Botigeli Sevegnani  
 Presidente CEUA/UNESP Registro

  
 Prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto  
 Vice-presidente CEUA/UNESP Registro

Av. Nelson Brihi Badur, 430. Vila Tupy. Registro/SP.  
 Fone: 13 3828 3048 e-mail: ceua.registro@unesp.br

## 2. APÊNDICE B

Carta de aprovação do Comitê de  tica no Uso de Animais da Generalitat Valenciana para o uso de enguia europeia *Anguilla Anguilla* nos experimentos.



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca  
Ciudad Administrativa 9 de Octubre  
Calle de La Democracia, 77 · 46018 València  
www.gva.es

### PROCEDIMIENTO 2023-VSC-PEA-0039

Vista la solicitud realizada en fecha **06/03/23** con n  reg. entrada **GVRTE/2023/1029992** por D/D . Jose Esteban Capilla Roma, Rector Universidad Polit cnica de Valencia, centro usuario **ES462500001091**, para realizar el procedimiento:

*“Experimentación con anguilas europeas (anguilla anguilla) 2022-2026”*

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

#### AUTORIZO:

La realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2023-VSC-PEA-0039** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat Polit cnica de València**

Responsable del proyecto: **Juan Francisco Asturiano Nemesio**

Establecimiento: **Universitat Polit cnica de València**

Necesidad evaluación retrospectiva: **No**

Condiciones específicas: **Art.19 RD 53/2013, Art.22 RD 53/2013**

- Art. 19: Utilización de animales de las especies no incluidas en el anexo I que no procedan de centros de crío o suministro.

- Art. 22: Uso de animales capturados en la naturaleza

Valencia a, fecha de la firma electrónica  
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por Antonio Quintana Martínez el  
19/04/2023 11:05:25  
Cargo: Director General de Agricultura,  
Ganadería y Pesca

### 3. APÊNDICE C

Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Generalitat Valenciana para o uso de dourada *Sparus aurata* nos experimentos.



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca  
 Ciudad Administrativa 9 de Octubre  
 Calle de La Democracia, 77 · 46018 València  
 www.gva.es

#### PROCEDIMIENTO 2022 VSC PEA 0230

Vista la solicitud realizada en fecha **14/09/22** con nº reg. entrada **GVRTE/2022/2899103** por D/D<sup>a</sup>. Jaime Pérez Sánchez, Profesor de Investigación (CSIC), centro usuario **ES120330001055**, para realizar el procedimiento:

*"FishNUTRIWELL (Aproximaciones holísticas basadas en el uso de nuevas tecnologías para la mejora de la nutrición, salud y bienestar animal de peces en cultivo con la dorada como especie modelo)"*

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

#### AUTORIZO:

La realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2022 VSC PEA 0230** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Instituto de Acuicultura Torre de la Sal**

Responsable del proyecto: **Jaime Pérez Sánchez**

Establecimiento: **Instituto de Acuicultura Torre de la Sal**

Necesidad evaluación retrospectiva: **No**

Condiciones específicas: **Art.19 RD 53/2013**

- Art. 19: Utilización de animales de las especies incluidas en el anexo I que no hayan nacido ni hayan sido expresamente criados en centros oficialmente reconocidos.

Valencia a, fecha de la firma electrónica  
 El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por Antonio Quintana Martínez el  
 30/09/2022 09:31:39  
 Cargo: Director General de Agricultura,  
 Ganadería y Pesca

#### 4. APÊNDICE D

Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Generalitat Valenciana para o uso de robalo europeu *Dicentrarchus labrax* nos experimentos.



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca  
 Ciudad Administrativa 9 de Octubre  
 Calle de La Democracia, 77 · 46018 València  
 www.gva.es

#### PROCEDIMIENTO 2022 VSC PEA 0213

Vista la solicitud realizada en fecha **02/09/22** con nº reg. entrada **GVRTE/2022/2770991** por D/Dª. Ariadna Sitjà Bobadilla, Directora Inst. Acuicultura Torre de la Sal, centro usuario **ES120330001055**, para realizar el procedimiento:

*"Fisiología Reproductiva. Diversificación. (REPROAQUA)"*

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

#### AUTORIZO:

La realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2022 VSC PEA 0213** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Instituto de Acuicultura Torre de la Sal**

Responsable del proyecto: **Ana Mª Gómez Peris**

Establecimiento: **Instituto de Acuicultura Torre de la Sal**

Necesidad evaluación retrospectiva: **No**

Condiciones específicas: **No**

Valencia a, fecha de la firma electrónica  
 El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por Antonio Quintana Martínez el  
 16/09/2022 10:44:21  
 Cargo: Director General de Agricultura,  
 Ganadería y Pesca