



2



Universidade Federal do Rio Grande – RS
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Programa de Pós-Graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais

**Preservação *ex situ* de germoplasma do Pacu
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**

Adriano Rayol da Silva

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior
Coorientadora: Dr^a Carine Dahl Corcini

Rio Grande – RS
2017

Universidade Federal do Rio Grande – RS
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Programa de Pós-Graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais

**Preservação *ex situ* de germoplasma do Pacu (*Piaractus
mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**

Aluno: Adriano Rayol da Silva

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Coorientador: Dr^a Carine Dahl Corcini

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande – RS
2017

78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117

Dedico esta dissertação *in memoriam* a minha tia Cleonice, por ter feito parte da minha formação desde que iniciei esta minha caminhada como profissional, por ter acreditado e investido nos meus sonhos, não concluiria mais essa etapa se não fosse pela senhora. Te amo!

“Você quer saber a diferença entre um **mestre** e um **iniciante**?
O mestre falhou mais vezes do que o novato já tentou”.

- George Lucas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por seu imenso e incomparável poder, por ter me dado refrigério e paciência em momentos difíceis, por ser essa força onipotente que faz com que tudo coopere para o bem daqueles que persistem em meio às adversidades.

Aos meus pais Cleodete e Oziel, por sempre acreditarem nos meus sonhos e objetivos, por não medirem esforços para que eu conseguisse chegar até aqui, são parte importante nesta etapa da minha vida profissional, amo muito vocês.

Aos meus avós Tereza e Moacir por todo amor e carinho, que sem dúvida alguma me incentivaram a prosseguir e me fizeram concluir mais esta etapa muito importante em minha vida.

À toda a minha família pelo apoio moral, emocional e financeiro, sou grato por acreditarem em mim, mesmo que eu mesmo em muitos momentos não tenha acreditado.

Ao meu orientador Antonio Sergio por ter aceitado esse desafio em orientar uma pessoa vinda do outro lado do Brasil, pela paciência e puxões de orelha, sem os quais eu não teria retomado o foco e chegado até aqui. É imenso meu respeito e admiração não somente como profissional que és, mas também por ser esta pessoa maravilhosa e amiga.

Aos meus colegas do grupo de Reprodução Animal Comparada: Diego, Fernanda, Jéssica, Norton, Jorge, Carol, Lennon, Andreia, Sara, Bruno e Izani por terem me ajudado na fase de experimentação e na troca de experiências, levarei a lembrança de vocês comigo por qualquer caminho que eu venha trilhar.

As pessoas especiais do BAC: Bruna, Rafaela, Fernanda, Tayane, Taís, Lucas, Thiago e Ruth pela convivência nesses dois anos, mesmo vendo-nos apenas em disciplinas conjuntas, sempre estiveram preocupadas com meu bem-estar e dispostas a ouvir meus desabafos.

Aos meus companheiros de casa: Michael, Day e Lucas principalmente nos momentos de tensão que passei, sempre alegres e descontraídos, sem dúvida nenhuma me ajudaram bastante, é imenso meu carinho por vocês, torço pelo sucesso de cada um.

Ao meu querido e grande amigo David Carvalho, por ter me incentivado e acalmado em muitos momentos em que me encontrei desolado e triste, por sempre se preocupar comigo quando eu estava precisando de algo, por todo carinho e respeito, em minhas lembranças levarei o seu bom humor e os nossos momentos de risos, você é muito especial e tem um lugar guardado em meu coração.

As minhas amigas paraenses Paula, Glauce e Janaína por terem me acolhido quando cheguei aqui no Sul, sou imensamente grato.

Agradeço aos meus amigos da igreja Sara Nossa Terra, em especial ao Edinardo, Vitor, Janinne, Kerolaine, Júlia, Leandro que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais por disponibilizar disciplinas e professores excelentes, os quais foram de suma importância na agregação e enriquecimento de conhecimentos nestes dois anos.

Ao Repropel por ter cedido espaço em seu laboratório para que eu pudesse realizar as análises e pela disponibilização de pessoal capacitado que me ajudaram na conclusão desta dissertação.

A piscicultura Panamá LTDA, em especial aos proprietários Juan pai e Juan filho, pela estadia e por terem cedido os peixes utilizados neste trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa, sendo a qual de fundamental importância para minha estadia e desenvolvimento da minha pesquisa.

Enfim a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a conclusão desta pesquisa.

Muito Obrigado!

RESUMO

O *Piaractus mesopotamicus* é um peixe amplamente distribuído na América do Sul, sendo encontrado desde a bacia dos rios Paraná-Paraguai até a bacia do Prata. Além de fins comerciais sua produção também é destinada a programas de repovoamento de reservatórios, impactados por hidrelétricas. Pesquisas relacionadas à criopreservação de gametas de peixes têm avançado exponencialmente, isto se deve às suas aplicações e protocolos. Para que o esperma possa ser criopreservado corretamente é necessário que sejam adicionados diluentes e crioprotetores que permitam o armazenamento e proteção das células. O presente estudo teve como objetivo verificar a eficácia de diferentes crioprotetores como: DMSO, glicerol e metanol (5%; 7,5%; 10%; 12,5% e 15%) na criopreservação espermática do Pacu. Foram utilizados 14 machos de *P. mesopotamicus*, sendo utilizado o BTS como diluente padrão no congelamento de todas as amostras, acompanhado de diferentes crioprotetores. Todos os parâmetros da cinética celular foram avaliados pelo CASA, já a integridade de membrana, fluidez de membrana, integridade funcional de DNA, funcionalidade da mitocôndria, espécies reativas do oxigênio (EROS) e lipoperoxidação (LPO), foram avaliadas através de citometria de fluxo. O diluente com 7,5% de metanol apresentou motilidade total e progressiva maior que os demais tratamentos ($P < 0,05$), já no período de motilidade (PM) não houve diferença ($P > 0,05$) do tratamento com 5 % de metanol, entretanto as duas concentrações (5 e 7,5 % de metanol) foram superiores ($P < 0,05$) aos outros tratamentos. A velocidade média percorrida do tratamento com 7,5 % de metanol foi maior ($P < 0,05$) que os demais tratamentos, já a velocidade retilínea, distância média percorrida, distância curvilínea e retilínea foram maiores ($P < 0,05$) nos tratamentos com 7,5 e 10 % de metanol, não diferenciando entre si. O deslocamento lateral de cabeça foi menor ($P < 0,05$) em todas as concentrações dos tratamentos com metanol. O tratamento com 7,5 % de metanol esteve dentre os tratamentos com melhores resultados nas análises de integridade de membrana e funcionalidade de mitocôndria. Não houve diferença entre os tratamentos nas análises de fluidez de membrana e LPO. Portanto, indica-se o diluente BTS adicionado de 7,5 % de metanol na criopreservação espermática do *Piaractus mesopotamicus*, Pacu.

Palavras-chaves: Crioprotetores; criopreservação; danos celulares; preservação; reprodução.

ABSTRACT

The *Piaractus mesopotamicus* is a fish widely distributed in South America, found from the Paraná-Paraguay rivers bay until the Silver river bay. Beyond commercial purposes, its production is also designated to repopulation of reservoir programs impaired by hydroelectric plants. Researches related to fish gamete cryopreservation has advanced exponentially, due to its applications and protocols. It is necessary for the sperm, to be able for the process of cryopreservation, the addition of diluent and crioprotector that allows the storage and cell protection. The aim of the present study is to verify the efficiency of different crioprotector containing DMSO, glycerol and methanol (5%; 7,5%; 10%; 12,5% and 15%) utilized in Pacu sperm cryopreservation. In the present experiment, 14 *P. mesopotamicus* males were used; BTS were chosen as the standard diluent for cryopreservation in all samples adding the different cryoprotectants to be tested. All the sperm cells kinetic patterns were assessed with CASA and cellular integrity, membrane integrity, membrane fluidity, functional DNA integrity, mitochondrial functionality, reactive oxygen species (ROS) and lipoperoxidation (LPO) were analyzed by flow cytometry. The diluent with 7,5% of methanol presented higher total and progressive motility than the other treatments ($P < 0,05$), within the motility period (MP) there were no significant differences ($P > 0,05$) on treatment with 5% of methanol, however two concentrations (5 and 7,5% of methanol) were superior ($P < 0,05$) than the other treatments. The average speed traveled of 7,5% methanol treatment were greater than the other treatments ($P < 0,05$); now rectilinear velocity, average distance traveled, curvilinear and rectilinear distance were larger ($P < 0,05$) in 7,5 and 10% of methanol treatments, non-differentiated in between. The lateral dislocation of the head were smaller ($P < 0,05$) in all concentrations of the methanol treatments. The 7,5% methanol treatment was among the best result treatments in membrane integrity and mitochondrial functionality analysis. There were no differences between treatments within the membrane fluidity and LPO assay. Therefore, the addition of 7,5% methanol in BTS diluent is indicated to perform *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) sperm cryopreservation.

Key-words: Cryoprotectants; cryopreservation; cell damage; preservation; reproduction.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em dois segmentos, o primeiro é referente a introdução geral sobre o tema proposto e as referências utilizadas, o segundo segmento é representado por um único capítulo, que concebe o manuscrito que será submetido a revista Aquaculture, formatado conforme as normas da revista. Ao final do capítulo encontram-se os anexos (tabelas).

262	SUMÁRIO	
263	LISTA DE TABELAS	10
264	1. INTRODUÇÃO GERAL	11
265	1.1. Ecossistemas Aquáticos Continentais	11
266	1.2. Espécie de Estudo	11
267	1.3. Bancos de germoplasma	13
268	1.4. Criopreservação Espermática	14
269	1.5. Soluções diluidoras e Crioprotetores	15
270	1.6. Cinética espermática	16
271	1.7. Danos Celulares	17
272	2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
273	CAPÍTULO 1	31
274	Preservação <i>ex situ</i> de germoplasma do Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> , Holmberg, 1887)	32
275	RESUMO	32
276	1. Introdução	33
277	2. Materiais e Métodos	34
278	2.1. Captura dos animais e coleta do esperma	34
279	2.2. Criopreservação espermática	35
280	2.3. Avaliação pós-descongelamento	36
281	2.4. Integridade da Membrana	37
282	2.5. Fluidez da Membrana	37
283	2.6. Funcionalidade da mitocôndria	37
284	2.7. Índice de Fragmentação do DNA	37
285	2.8. Peroxidação lipídica	38
286	2.9. Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	38
287	2.10. Análises Estatística	38
288	3. Resultados	39
289	4. Discussão	39
290	5. Conclusão	42
291	6. Referências	42
292	ANEXOS	45

293

294

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da cinética espermática e citometria dos danos sobre as estruturas das células espermáticas do Pacu pós-descongelamento.Os dados são expressos como média e erro padrão da média.....	45
Tabela 2. Análise da cinética espermática dos diferentes tratamentos, DMSO, Glicerol e Metanol nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5; 15 % do esperma descongelado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> . Os dados são expressos como média e erro padrão da média.....	46

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Ecossistemas Aquáticos Continentais

Os ecossistemas aquáticos mais especificamente os continentais apresentam certas peculiaridades quando comparados aos outros tipos de ecossistemas, já são formados por um complexo sistema de águas interiores (lagos, represas, rios, pântanos, lagoas costeiras e outros corpos de águas interiores), conferindo uma alta heterogeneidade a estes ambientes e uma grande diversidade biológica (TUNDISI *et al.*, 2006a).

Esses ecossistemas apresentam grande importância ecológica e socioambiental, oferecendo serviços à população como: abastecimento de água, lazer, turismo, além de contribuírem indispensavelmente na manutenção da biodiversidade (JUNK *et al.*, 2014).

Entretanto, com a crescente interferência antrópica sobre os sistemas aquáticos continentais, a sua biodiversidade vem apresentando-se em grande declínio (SALA *et al.*, 2000).

Vários são os causadores da diminuição da biodiversidade, como a introdução de espécies exóticas, a destruição de florestas e das matas ciliares, a drenagem de várzeas, a construção de hidrelétricas, a erosão acelerada dos solos e a poluição dos rios (doméstica ou industrial e por insumos agrícolas). Estes impactos resultam na perda de habitats adequados para alimentação, interrupção na migração reprodutiva de peixes, crustáceos, aves, répteis e anfíbios (AGOSTINHO & PELICICE, 2007; HUMPHRIES & WINEMILLER, 2009). Além disso, esses fatores somados a disponibilidade de água limpa e habitat adequado influenciam direta ou indiretamente na viabilidade das populações (QUINN, 2005).

Os impactos supracitados resultam na inserção de novas espécies na lista de animais ameaçados de extinção no Brasil. Segundo a Portaria do MMA nº 445, de 17 de setembro de 2014, foram listadas 1.173 espécies ameaçadas de extinção (ICMBio 201).

1.2. Espécie de Estudo

O *Piaractus mesopotamicus* conhecido popularmente como pacu ou pacu-caranha nas regiões Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, não está incluído no livro de espécies ameaçadas de extinção do Brasil. É um peixe migrador pertencente à superordem Ostariophysi, na qual estão incluídos os peixes com maior representatividade comercial tanto na pesca como na aquicultura (URBINATI *et al.*, 2005).

O Pacu está classificado taxonomicamente como pertencente à ordem Characiformes ao qual apresenta uma grande abundância de espécies de peixes de água doce Sul-Americanas, com hábitos alimentares generalistas e especialistas. Este grupo possui ampla distribuição geográfica na região neotropical, apresenta o maior número de famílias e espécies descritas. Dentro dos Characiformes, o Pacu é classificado como pertencente à subfamília Myleinae e gênero *Piaractus*, ambos representados por peixes onívoros, preferencialmente frugívoros (URBINATI *et al.*, 2005).

O pacu é amplamente distribuído na América do Sul, sendo encontrado desde a bacia dos rios Paraná-Paraguai até a bacia do Prata (GODOY, 1975). No Brasil os espécimes desta espécie podem ser observados nas planícies alagadas do Pantanal mato-grossense (PETRERE Jr, 1989). Alimentam-se preferencialmente de folhas, frutos, caules, flores e sementes, porém quando há necessidade ou disponibilidade se alimentam de peixes, aracnídeos, moluscos e insetos, podendo ser classificada como uma espécie onívora. Além disso, sua alimentação varia com a sazonalidade hídrica. Na estação chuvosa os indivíduos se mantêm nas áreas inundadas, alimentando-se de vegetais, já na estação seca permanecem no leito principal dos rios com pouca disponibilidade de alimento, ingerido o alimento que estiver disponível (SILVA, 1985; MENTON, 1989).

O *P. mesopotamicus* segundo Urbinati *et al.*, (2005), apresenta desova total e fecundação externa, suas migrações reprodutivas e maturação gonadal ocorrem simultaneamente durante a estação de seca e sua desova culmina no período intenso de chuvas, principalmente em novembro. A maturação das gônadas ocorre quando as fêmeas alcançam idade média de 3 anos e 42 cm de comprimento, nessa idade e tamanho, elas encontram-se aptas a reprodução (FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984).

As fêmeas produzem em média 1.200 ovócitos a cada desova (BOCK & PADOVANI, 2000; MURGAS *et al.*, 2002). Após a fecundação, os reprodutores se direcionam para as áreas alagadas a procura de alimento. O nível da água favorece o transporte dos ovos e larvas para as regiões alagadas mais distantes, onde a prole encontrará condições adequadas para seu desenvolvimento (FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984).

Dados pesqueiros demonstraram que o Pacu foi intensamente capturado nos anos de 1996 e 1997 por pescadores profissionais e esportivos em Corumbá e no Pantanal do Mato Grosso (MS). Estes dados expressaram a sobre-exploração do Pacu e sugeriram medidas restritivas sobre sua captura (PEIXER *et al.*, 2007). A sobrepesca do *P. mesopotamicus* tem sido apontada como fator expressivo de impacto aos ambientes de água doce, tendo em vista a

importância ecológica desta espécie para os ambientes aquáticos, uma vez que o pacu é um peixe onívoro com preferência a frugívoro, ou seja, proporcionam a dispersão de sementes, pois possuem dentição apropriada para esta função, que é de suma importância na regeneração de matas ciliares (GALLETI *et al.*, 2008).

Devido a sua relevante importância ecológica e para a aquicultura brasileira, pesquisadores vêm tentando otimizar as técnicas empregadas sobre o cultivo do pacu. Inúmeras técnicas envolvendo esta espécie já são dominadas, principalmente na área reprodutiva (URBINATI *et al.*, 2005), como: biologia reprodutiva (PAULINO *et al.*, 2011); qualidade espermática após adição de compostos iônicos (MARIA *et al.*, 2015). Todavia estudos com enfoque na preservação *ex-situ* precisam ser estabelecidos para esta espécie.

1.3. Bancos de germoplasma

Como alternativa de preservação *ex-situ*, tem-se criado os bancos de germoplasma com objetivo de evitar a perda de recursos genéticos de espécies ameaçadas pela ação antrópica. O material coletado é armazenado em baixas temperaturas, conservando assim os genes para serem usados em longo prazo em diversos procedimentos biotecnológicos (BARBIERI *et al.*, 2003).

Os benefícios obtidos com a criação de bancos de germoplasma para a preservação da diversidade genética são muito relevantes. Além da preservação do vigor genético e aumentar a propagação em ambiente natural através da reprodução artificial, estes depósitos congelados podem oferecer um altíssimo nível quanto a segurança contra a perda da variabilidade genética (EIDT, 2013).

Os bancos de germoplasma também ampliam o gerenciamento do uso do material biológico, impedindo a queda no volume de colônias em período reprodutivo e proporcionando uma maior segurança ao transporte e manuseio de genótipos, possibilitando a propagação de germoplasma congelado em vez de animais vivos (YUSKSEL, 2012).

Vários tipos de células já foram testados na construção de bancos de germoplasma de peixes. Entretanto ovos e embriões de peixes não se adequam aos processos de congelamento, por causa do seu grande tamanho, teor lipídico elevado, organização polar (BLESBIOS & LABBÉ, 2003), e impermeabilidade da membrana (HAGEDORN *et al.*, 1998). Somente a célula espermática tem demonstrado resultados aplicáveis na maioria dos estudos, possibilitando sucesso e estabilidade à técnica de criopreservação espermática.

1.4. Criopreservação Espermática

Para manter a variabilidade genética é importante que o material biológico a ser preservado seja coletado a partir de espécimes selvagens, armazenado e posteriormente utilizado sem remover mais indivíduos de seus habitats (WIIDT, 1992).

Pesquisas relacionadas à criopreservação de gametas de peixes têm avançado exponencialmente, isto se deve às suas aplicações a diversas espécies e também pela busca incessante da padronização dos protocolos pré-existentes para algumas destas (ASTURIANO *et al.*, 2001).

A criopreservação em termos gerais é considerada como uma ferramenta biotecnológica na conservação de gametas (masculino e feminino) na área da reprodução animal, sendo assim responsável pela preservação de linhagens reprodutivas ameaçadas de extinção (DIWAN *et al.*, 2010). Esta técnica visa à preservação do material genético, por meio do congelamento a -196°C. Nesta temperatura é mantida tanto a estrutura quanto a funcionalidade das células e/ou tecidos (PEGG, 2007).

Para Tiersh & Mazik (2000) a criopreservação é uma biotecnologia que permite otimizar a utilização de sêmen de inúmeras espécies, para fins de estudos, comercialização e até mesmo na preservação das mesmas. A criopreservação de esperma de peixes também possibilita a reposição de estoques de espécies ameaçadas pela sobrepesca, além da eliminação de problemas causados pela assincronia da maturação sexual entre machos e fêmeas (VIVEIROS, 2005; MARIA *et al.*, 2009).

A célula espermática é ideal para este tipo de pesquisa. Por ser pequena ela apresenta fácil armazenamento, sua estrutura celular é especializada e tem demonstrado resistência à refrigeração e congelamento (BOBE & LABBÉ, 2010). Estas células apresentam características que variam entre as espécies, diferentemente dos mamíferos, reptéis e anfíbios, a membrana plasmática dos espermatozoides dos peixes, devido a fecundação externa, assumiu adaptações para resistir ao meio aquático (HOLT, 2000).

As fases de refrigeração, congelamento e descongelamento ocasionam alguns processos químicos e biofísicos como: mudança de osmolaridade, desidratação, reidratação, mudança de volume celular e formação de cristais de gelo (crioinjúrias) (CABRITA *et al.*, 2013). Logo, é necessário que seja adicionado uma solução diluidora com a função de fornecer nutrientes às células e crioprotetores permeáveis e impermeáveis a membrana que

possibilitem proteção aos espermatozoides contra choques-térmicos causados pela diminuição e/ou aumento da temperatura (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2010).

1.5. Soluções diluidoras e Crioprotetores

Em geral, os diluentes devem apresentar em sua formulação, carboidratos para fornecimento de energia; tampões, com capacidade de realizar o equilíbrio pH; antibióticos, para que não haja multiplicação microbiana no sêmen (PURDY, 2006a).

Vários meios diluidores já foram testados no congelamento de sêmen de peixes, dentre eles a solução de glicose 5% é uma das mais conhecidas e utilizadas, ela tem se destacado, pois apresenta algumas características como: ação crioprotetora devido ao seu peso molecular; fornecer energia, atuando como substrato na célula; além de ser controladora do equilíbrio osmótico na célula (HOLT, 2000).

O BTS (*Beltsville Thawing Solution*) inicialmente utilizado para conservar sêmen de suínos, tem demonstrado resultados promissores no congelamento de esperma de peixes nativos brasileiros (FRANCISCATTO *et al.*, 2002; MARIA *et al.*, 2004; MILIORINI *et al.*, 2004) como: *Colossoma macropomum* (VARELA *et al.*, 2012a), *Brycon nattereri* (OLIVEIRA *et al.*, 2007), *Prochilodus lineatus* (MILIORINI, *et al.*, 2011), *Brycon orbignyanus* (MARIA *et al.*, 2006) e *Leporinus obtusidens* (MURGAS *et al.*, 2002).

Além da nutrição, os diluentes também são carreadores de crioprotetores que protegem as células espermáticas contra os malefícios do congelamento. Esta função é de extrema importância, pois no congelamento há a formação de cristais e a desidratação da célula, e no descongelamento há a reidratação da célula, que conseqüentemente interfere sobre a mudança na fase de transição dos fosfolípidios presentes na membrana plasmática (PARCKS & GRAHAN, 1992). Contudo, os crioprotetores devem apresentar ainda, baixa toxicidade para as células e serem altamente solúveis em água (MARIA *et al.*, 2006).

Os crioprotetores são classificados de acordo com sua funcionalidade como penetrantes e não penetrantes a membrana celular. Os penetrantes, são responsáveis pela retirada da água presente dentro da célula, conseqüentemente interferem na formação dos cristais de gelo. Dentre os crioprotetores penetrantes utilizados em congelamento seminal de peixes alguns têm demonstrado resultados promissores, os mais comumente utilizados são: os álcoois: Dimetilsulfóxido; metilglicol; glicerol; etilenoglicol e metanol, e amidas (dimetilformamida, dimetilacetamida e metilformamida); (SALMITO-VANDERLEY,

2010; LEITE, 2011; VIVEIROS *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2012; VIVEIROS *et al.*, 2012).

O Dimetilsulfóxido tem demonstrado resultados significativos no congelamento seminal de peixes, pois penetra facilmente na membrana plasmática da célula espermática, ligando-se às hidroxilas livres que são responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio, além disso, este componente é altamente solúvel em meio aquoso (AKYURE *et al.*, 2000; MACGREGOR, 1967).

O metanol segundo Harvey (1993) é o crioprotetor que permeia mais facilmente a membrana plasmática das células, devido ao seu alto nível de solubilidade em meio aquoso, porém em muitas espécies tem demonstrado alto nível de toxicidade, exceto para esperma criopreservado de tilápia.

O glicerol é outro álcool largamente empregado em programas de preservação de gametas masculinos de diversas espécies (ALVARENGA *et al.*, 2005). Porém este componente tem demonstrado algumas desvantagens para algumas espécies, quando comparado a outros crioprotetores, especialmente sobre a integridade das estruturas celulares, devido ao seu peso molecular alto, alta viscosidade e nível elevado de impermeabilidade (HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992).

Há uma preservação das amostras com a adição de diluidores não-penetrantes que formam uma película externa protetora e atuam como estabilizadores da membrana celular e restituem os fosfolipídios que são perdidos pelo choque térmico causado durante o congelamento espermático (CAROLSFELD & HARVEY, 1999). Macromoléculas de alto peso molecular são os principais representantes, dentre elas destacam-se os dissacarídeos e a trealose; lipoproteínas de baixa densidade molecular (VARELA JUNIOR *et al.*, 2009), água de coco e leite em pó (AMMANN & PICKETT, 1987; VIVEIROS & GODINHO, 2009).

O uso combinado desses dois tipos de crioprotetores minimiza os danos e promove reparos celulares causados pelos processos de congelamento e descongelamento (SALMINTO-VANDERLEY *et al.*, 2012).

1.6. Cinética espermática

Inúmeros estudos referentes à criopreservação espermática vêm apontando a motilidade espermática como o fator mais utilizado na avaliação da qualidade espermática entre as espécies (SCHOBER, 2007). Seus resultados são obtidos através da porcentagem de

espermatozoides móveis no esperma ativado em decorrência do tempo. Em trutas após o descongelamento seminal, o tempo dos espermatozoides móveis pôde variar de 20 a 25 segundos, no barrigudinho (*Poecilia reticulata*) o tempo pode chegar a 1 hora (COSSON *et al.*, 1999b), em espécies marinhas com fecundação interna como *Macrozoarces americanus*, este tempo foi prolongado em até 48 horas (YAO *et al.*, 1999).

Os espermatozoides de peixes com fecundação externa e interna apresentam-se inativos quando encontrados dentro das gônadas masculinas. Em espécies com fecundação externa, a ativação ocorre quando os gametas entram em contato com o meio aquoso, já em espécies com fecundação interna a ativação se dá dentro do trato feminino, devido a alterações da osmolaridade (STOSS, 1983).

Em espécies ovíparas de ambientes de água doce, a motilidade pode ser inibida também, quando o meio apresenta osmolaridade maior que a do plasma seminal (acima de 200 mOsm) e ativada quando o ambiente apresenta osmolaridade menor que 200 mOsm (CIERESZKO *et al.*, 2000). Outra forma de ativação espermática é através das concentrações de íons potássio. Neste caso a motilidade é estimulada quando as concentrações encontradas no plasma seminal são menores que 25 mM e quando maiores que 40 mM, ocorre inibição da motilidade (CIERESZKO *et al.*, 2000).

Devido a esses fatores, torna-se de extrema importância o cuidado com a osmolaridade que os diluentes devem possuir, pois as células podem ser ativadas durante o processo de congelamento espermático (CHAMBEYRON & ZOHAR, 1990).

Os resultados expressos pela motilidade são necessários, pois demonstram também a integridade de organelas celulares, além disso, sem motilidade, as células espermáticas não conseguirão encontrar o oócito e com tempo de motilidade insuficiente os espermatozoides em especial de peixes, não conseguirão encontrar a micrópila aberta, inviabilizando assim a fecundação (CALDAS *et al.*, 2014).

1.7. Danos Celulares

Tem sido grande a utilização de sondas fluorescentes em avaliações espermáticas, pois possuem capacidade de marcar e detectar claramente a integridade de estruturas específicas e a funcionalidade das mesmas (CELEGHINI *et al.*, 2005). Estas sondas apresentam mecanismos com atividade óptica e fluorescente (COSSARIZZA *et al.*, 1993). Assim, lesões sobre a mitocôndria podem ser avaliadas pela Rodamina 123 (Mito Tracker Green FM e Mito

Tracker Reed, JC-1), que possibilita a identificação de mitocôndrias em células vivas (ARRUDA *et al.*, 2004), identificando as distintas subpopulações espermáticas que apresentam alta ou baixa atividade mitocondrial (GRAHAM, 2001).

A mitocôndria encontrada na peça intermediária do espermatozoide é responsável pela produção de energia, a qual possibilita mobilidade a célula. A energia é formada pelas reações de oxidação na cadeia transportadora de elétrons (respiração celular), sendo armazenada como gradiente eletroquímico com capacidade de sintetizar a Adenosina Trifosfato (ATP), utilizada como principal combustível nos processos celulares e movimentos da cauda do espermatozoide (BARTH & OKO, 1989).

A membrana plasmática é responsável pelo balanço homeostático celular e atua como barreira entre o meio interno e externo. Avaliações sobre a membrana plasmática podem ser indicativos importantes do sucesso da criopreservação, visto que a membrana é extremamente sensível aos danos causados pela formação dos cristais de gelo (AMANN & PICKETT, 1987).

Uma das formas de avaliar a integridade da membrana plasmática das células espermáticas é com o diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídio, combinados. Em espermatozoides íntegros ocorre a penetração do diacetato de carboxifluoresceína através da membrana plasmática, as esterases internas à membrana convertem este composto em fluoresceína, que fica retida no citoplasma, proporcionando coloração verde a célula. Já o iodeto de propídio se integra ao DNA, corando-o em vermelho, somente quando a membrana plasmática estiver lesionada (GILLAN *et al.*, 2005). Sondas específicas para o DNA como: Hoechst 33258 (H258), Hoechst 33342 (H342) e SYBR- 14, são utilizadas também para avaliar a integridade da membrana plasmática (CELEGHINI *et al.*, 2007).

A avaliação da integridade do DNA se faz necessária, pois este ponto é fundamental para que ocorra com sucesso o desenvolvimento do embrião fecundado, tendo em vista que o aumento de espermatozoides com DNA fragmentado por crioprotetores ou pela criopreservação aumentam as chances de fertilização de oócitos por um espermatozoide com DNA lesionado (VARELA JUNIOR *et al.*, 2012b). A estimativa de espermatozoides com DNA lesionado podem demonstrar resultados negativos sobre as taxas de fertilização e eclosão (CABRITA *et al.*, 2010; VARELA JUNIOR *et al.*, 2012b).

Autores como Partykaet *al.* (2010), afirmam que a integridade do DNA não se altera independente da exposição do espermatozoide a temperaturas baixas, provavelmente, devido

a cromatina do espermatozoide apresentar-se de forma condensada, compacta e protegida pela membrana nuclear, quando comparada aos seus estágios de desenvolvimento.

A integridade da cromatina de células espermáticas tem sido avaliada, através do uso da acridineorange, um corante que se adere a fita dupla do DNA. Quando esta estrutura não está lesada é corada em verde; porém quando a fita de DNA ou RNA encontra-se desnaturada, a acridine marca fluorescência laranja - vermelho, possibilitando a quantificação das células lesionadas em uma determinada amostra (ARRUDA *et al.*, 2004).

1.8.Estresse Oxidativo

Além dos danos já mencionados, a criopreservação é responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas facilmente durante o processo da respiração celular, interação com compostos orgânicos e através de sistemas intracelulares de enzimas (NADPH-oxidase). A célula criopreservada é tamponada pelos componentes do diluente, porém quando as EROS ultrapassam a capacidade antioxidante destes compostos, ou da própria célula, ocorre o estresse oxidativo, que pode resultar em danos ao DNA, lipoperoxidação (LPO) e oxidação das proteínas (AITKEN, 1995).

Devido ao volume citoplasmático dos espermatozoides encontrarem-se baixos quando comparados ao de células somáticas, a ação antioxidante é dependente do plasma que as células estão imersas (ALVAREZ *et al.*, 1987). Com o enovelamento do material genético, essas células espermáticas são incapazes de transcrever ou traduzir o material genético, possibilitando ação enzimática antioxidante muito limitada. Além disso, os lipídios presentes em suas membranas plasmáticas são ricos em ácidos graxos poli-insaturados, sendo suscetível a peroxidação lipídica (JONES *et al.*, 1979).

A peroxidação lipídica ocorre quando o peróxido de hidrogênio gerado liga-se ao ânion superóxido, por ser mais estável e menos polar, atravessando facilmente a membrana citoplasmática (HALLIWELL & CHIROCO, 1993). Em decorrência disto, o peróxido de hidrogênio é apontado como o principal agente causador de danos oxidativos em espermatozoides preservados, e a peroxidação lipídica da membrana celular pode ser considerada como uma atividade de ação não enzimática (AITKEN *et al.*, 1993; AITKEN 1995). Como consequências desse estresse a membrana plasmática aumenta fluidez e compromete sua integridade, que são indispensáveis à manutenção do metabolismo celular e conclusão da fertilização (STOREY, 1997).

Este estudo justifica-se pois não há na literatura pesquisas que utilizem os crioprotetores penetrantes DMSO, Glicerol e Metanol sem auxílio de crioprotetores externos no congelamento espermático de pacu e não há estudos que utilizem a citometria de fluxo para quantificar os danos sobre as organelas citoplasmáticas dos espermatozoides. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi verificar a eficácia dos diferentes crioprotetores penetrantes DMSO, Glicerol e Metanol, nas concentrações (5; 7,5; 10; 12,5 e 15%), utilizados no processo de criopreservação espermática do Pacu.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A. GOMES, L. C. PELICICE, F. M. 2007. Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. Maringá: Eduem. p. 501.
- AITKEN, R. J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *ReprodFertil Dev*, 7, 659–668.
- AITKEN, R. J. BUCKINGHAM, D. HARKISS, D. 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J ReprodFertil*, 97, 441–50.
- ALVARENGA, M. A. PAPA, F. O. LANDIM-ALVARENGA, F. C. MEDEIROS, A. S. L. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*; 89, 105–113.
- ALVAREZ, J. G. TOUCHSTONE, J. C. BLASCO, L. STOREY, B. T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 8, 338–48.
- AKYURE, K. N. KAFALI, E. M. MUHTAROGLU, S. SURG. 2000. The effect of dimethyl sulphoxide on experimental hepatic ischemia. *Swiss*; 6, 23-27.
- AMANN, R. P. PICKETT, B. W. 1987. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *EquineVeterinaryScienci*, 7, 145-174.

667

668 ARRUDA, R. P. CELEGHINI, E. C. C. ANDRADE, A. F. C. GARCIA, A. R.
669 NASCIMENTO, J. RAPHAEL, C. F. SOUZA, L. W. O. 2004. Importância da qualidade do
670 sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE
671 REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. Anais, Londrina, Brasil. 166-179.

672

673 ASTURIANO, J. F. SORBERA, L. A. CARRILO, M. ZANUY, S. RAMOS, J. NAVARRO,
674 J. C. BROMAGE, N. 2001. Reproductive performance in male European sea bass
675 (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA – enriched experimental diets: a comparison with
676 males fed a wet diet. *Aquaculture*, 194, 173–190.

677

678 BALL, B. A. VO, A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of
679 soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane
680 potential. *JAndrol*; 22, 1061–1069.

681

682 BOBE, J. LABBÉ, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative*
683 *Endocrinology*, 165, 535-548.

684

685 BARBIERI, G. SALLES, F. A. CESTAROLLI, M. A. 2003. Influência de fatores abióticos
686 na reprodução de do dourado, *S. maxillosus* e do Curimbatá, *Prochilodus lineatus* do Rio
687 Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). *Acta Limnológica Brasileira*, 12, 85-91.

688

689 BARTH, A. D. OKO, R. J. 1989. Anormal morphology of bovine spermatozoa. *Estados*
690 *Unidos: Iowa State University Press*, 285p.

691

692 BLESBIOS, E. LABBE, C. 2003. Main improvement in semen and embryos cryopreservation
693 for fish and fowl. In: Planchenault D, editor. *Workshop on Cryopreservation of Animal*
694 *Genetic Resources in Europe*; Paris, France, 55–66.

695

696 BOCK, C. L. PADOVANI, C. R. 2000. Considerações sobre a reprodução artificial e
697 alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. *Acta*
698 *scientiarum, Maringa*, 22, 495-501.

699

CABRITA, E. MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. PACCHIARINI, T. GAVAIA, P. J. RIESCO, M. VALCARCE, D. G. SARASQUETE, C. HERRÁEZ, M. P. ROBLES, V. 2013. Factors affecting sperm quality and emerging tools for sperm analysis. In: Hendry, C.I. (Ed.), Larvi 2013, Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Ghent, Belgium, 58–59.

CABRITA, E. *et al.*, 2010. Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. J Appl Ichthyol, 26, 623–635.

CARROSFELD, J. HARVEY, B. 1999. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. In: Curso de treinamento brasileiro. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust. p.47.

CALDAS, J. S. 2014. Dimetil sulfoxido, Etileno glicol e Glicerol na criopreservação seminal de *Geophagus brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul – Brasil. 51 p.

CELEGHINI, E. C. C. *et al.* 2007. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. Reproduction in Domestic Animals, 42, 479-88.

CELEGHINI, E. C. C. *et al.* 2005. Uso de CMXROS e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2005, Angra dos Reis. Acta Sci. e Veterinariae, 33, 321-321.

CHAMBEYRON, F. ZOHAR, Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead Seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture, v. 345-52, 1990.

CIERESZKO, A. GLOGOWSKI, J. DABROWSKI, K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge: Louisiana. p. 20-48.

- COSSARIZZA, A. B. BACCARANI-CONTRI, M. KALASHNIKOVA, G. FRANCESCHI, C. 1993. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethyl benzimidazole carbocyanine iodide (JC-1). *Biochemistry Biophysic Research Communications*, 197, 40- 45.
- COSSON, J. F. PONS, J. M. MASSON, D. 1999b. Effects of forest fragmentation on frugivorous and nectarivorous bats in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology*, 15, 515-34.
- COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.
- DIWAN, A. D. AYYAPPAN, S. LAL, K. K. LAKRA, W. S. 2010. Cryopreservation of fish gametes and embryos. *Indian Journal of animal Sciences*. New Delli, 80, 109-124.
- EIDT, A. A. 2013. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para conservação de espécies e aquicultura. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS, Faculdade de Veterinária, 48 p.
- FERRAZ DE LIMA, J. A. BARBIERI, G. VERANI, J. R. 1984. Período de reprodução, tamanho e idade de primeira maturação gonadal do pacu, *Colossoma mitrei*, em ambiente natural (Rio Cuiabá, Pantanal do Mato Grosso). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, São Carlos, SP: ABRAq. 477-497.
- FRANCISCATTO, R. T. MURGAS, L.D. S. MILIORINI, A. B. 2002. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26, 213-215.
- GALETTI, M. DONATTI, C. I. PIZO, M. A. GIACOMINI, H. C. 2008. Big fish are the best: Seed Dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. *Biotropica*, 40, 386-389.

- GILLIAN, L. EVANS, G. MAXWELL, W. M. C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63, 445-57.
- GALETTI, M. DONATTI, C. I. PIZO, M. A. GIACOMINI, H. C. 2008. Big fish are the best: Seed Dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. *Biotropica*, 40, 386-389.
- GODOY, M. P. 1975. Peixes do Brasil: subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Franciscana, 1-4. p. 2016.
- GRAHAM, J. K. 2001. Assessment of sperm quality. *AAEP Proceedings*, 47, 302-305.
- HAGEDORN, M. KLEINHANS, F. W. ARTEMOV, D. PILATUS, U. 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biol.Reprod.*, 59, 1240–1250.
- HALLIWELL, B. CHIROCO, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*, 57, 715–725.
- HAMMERSTEDT, R. H. GRAHAM, J. K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29, 26–38.
- HARRISON, R. A. P, VICKERS, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*, 88, 343-352.
- HARVEY, B. CAROLSFELD, J. 1993. Preservation of sperm. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Eds.) *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: International Development Research Center, 119-130.
- HOLT, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Repro. Sci*, 62, 3–22.

- HORVATH, A. URBANYI, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. *Aquaculture Research*, 31, 317–24.
- HUMPHRIES, P. L. & WINEMILLER, K. O. 2009. Historical impacts on river fauna, shifting baselines and challenges for restoration. *Bio Science*, 59, 673-684.
- ICMBio. Espécies ameaçadas – Lista 2014. Disponível em: <Acesso em: 23 de janeiro de 2017>.
- JIAN-HONG *et al.*, 2010. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*, 121, 72–77.
- JOMORI, R. K., et al., 2005. Economic evaluation of (*Piaractus mesopotamicus*) juvenile e production in different rearing systems. *Amsterdam. Aquaculture*, 175-183.
- JONES, R. HAMILTON, D. W. FAWCETT, D. W. 1979. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductus deferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am J Anat*, 156, 373–400.
- JUNK, W. J. PIEDADE, M. T. F. LOURIVAL, R. WITTMANN, F. KANDUS, P. LACERDA, L. D. BOZELLI, R. L. ESTEVES, F. A. NUNES DA CUNHA, C. MALTCHIK, L. SCHÖNGART, J. SCHAEFFER-NOVELLI, Y. AGOSTINHO, A. A. 2014. Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. *Aquatic Conservation: Mar Freshwater Ecosyst*, 24, 5-22.
- LIMA, J. A. F. BARBIERI, G. 1983. Período de reprodução, tamanho e idade de primeira maturação sexual do pacu, *Colossoma mitrei*, em ambiente natural (Rio-Cuiabá-Pantanal do Mato Grosso). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, São Carlos.
- LABBE, C. CROWE, L. M. CROWE, J. H. 1997. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze–thawing. *Cryobiology.*, 34,176–82.

LEITE, L. V. 2011. Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de Tambaqui. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

MACGREGOR, W. J. 1967. The chemical and physical properties of DMSO. *Ann N. Y. AcadSci.*, 141, 3-12.

MARIA, A. N MURGAS, L. D. S. SILVA, M. O. B MILIORINI, A. B. FRANCISCATTO, R. T. LOGATO, P. V. R. 2004. The effects of potassium iodide and sodium citrate on semen quality of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Ciênc. agrotec.*, 28, 191-194.

MARIA, A. N. AZEVEDO, H. C. CARNEIRO, P. C. F. 2009. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, M. (Org.). *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. 1 ed. Amapá: Embrapa Amapá, 1, 47-63.

MARIA, N. A. 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.

MARIA, A. N. MURGAS, L. D. S. SILVA, M. O. B. MILIORINI, A. B. FRANCISCATTO, R. T. LOGATO, P. V. R. 2004. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 28, 191-194.

MARTÍNEZ JG, TARAZONA-MORALES A. M. PARDO-CARRASCO, S. C. 2012. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. *AnimReprod*, 9, 9-26.

MENTON, D. J. 1989. Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: HERNANDEZ, R. *Cultivo de Colossoma*. Bogotá: Guadalupe. p. 75-84.

MILIORINI, A. B. MURGAS, L. D. S. ROSA, P. V. OBERLENDER, G. PEREIRA, G. J. M. COSTA, V. D. 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after Cryopreservation. *Aquaculture Research*, 42, 177-87.

MILIORINI, A. B. MURGAS, L.D. S. VIVEIROS, A.T. M. 2004. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15. 2004, Porto Seguro. Anais. p.523.

MURGAS, L. D. S. MILIORINI, A. B. FREITAS, R. T. F. PEREIRA, G. J. M. 2002. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26, 211-13.

OLIVEIRA, A. V. 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 1509-515.

PARKS, E. J. GRAHAM, J. K. 1992. Effects of cryopreservation procederes on sperm membranas. *Theriogenology*, 38, 209-222.

PAULINO, M. S. MILIORINI, A. B. MURGAS, L. D. S. LIMA, F. S. M. FELIZARDO, V. O. 2011. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de Buserelina. *Bol. Inst. Pesca*, 37, 39 – 45.

PARTYKA, A. NIZANSKI, W. LUKASZEEWICZ, E. 2010. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl sêmen by flow cytometry. *Theriogenology.*, 74, 1019- 1027.

PEGG, D. E. 2007. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2 ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 368, 39-58.

PEIXER, J. CATELLA, A. C. PETRERE Jr, M. 2007. Yieled per recruitofthe pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brasilian Journal of Biology*, 67, 561-567.

- PETREIRE Jr, M. 1989. River fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management*, 4, 1-16.
- PURDY, P. H. 2006a. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, 215-25.
- QUINN, T. P. 2005. The behavior and ecology of Pacific salmon and trout. University of Washington Press, Seattle, Washington, USA.
- SALA, O. E. CHAPIN, I.F. S. ARMESTO, J. J. BERLOW, E. BLOOMFIELD, J. DIRZO, R. HUBER SANWALD, E. HUENNEKE, L. F. JACKSON, R. B. KINZIG, A. LEEMANS, R. LODGE, D. H. MOONEY, H. A. OESTERHELD, M. LEROY POFF, N. SYKES, M. T. WALKER, B. H. WALKER, M. WALL, D. H. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287, 1770–1774.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. 2010. Reproductive Biotechnology in Fresh Water Fish. In: V Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal. Patos, Paraíba.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. VIEIRA, M. J. A. F. LEITE, L. V. OLIVEIRA, F. C. E. LINHARES, F. R. A. SALGUEIRO, C. C. M. NUNES, J. F. 2012. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciênc. Anim*, 22, 255- 268.
- SCHÖBER, D. AURICH, C. NOHL, H. GILLE, L. 2007. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 68, 745- 754.
- SILVA, A. J. 1985. Aspectos de alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) (Pisces, Characidae), no pantanal de Mato Grosso. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.
- STOREY, B. T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Human Reprod*, 3, 203–213.

- STOSS, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: Fish Fisiology, cap. 6, v. IX, HOAR, W.; RANADALL, D.; DONALDSON, E. New York: Academic Press.
- TIERSCH, T. R, MAZIK, P. M. 2000. Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- TUNDISI, J. G. TUNDISI, T. M. ABE, D. S. ROCHA. O. STARLING, F.2006b. Limnologia de águas interiores: impactos, conservação e recuperação de ecossistemas aquáticos. In: REBOUÇAS, A. C. BRAGA, B. TUNDISI, J. G. (Orgs.). Águas Doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 3 ed. São Paulo: Escrituras, p. 203-240.
- URBINATI, E. C. GONÇALVES, F. D. TAKAHASHI, L. S. 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs.) Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, p. 225-255.
- VARELA JUNIOR, A. S. CORCINI, C. D. STREIT JR, D. P. RIZZOTO, G. JARDIM, R. D. LUCIA JR, T. FIGUEIREDO, M. P. C. 2012A. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do Dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de Tambaqui *Colossoma macropomum*. Atlântida, 34, 129-37.
- VARELA JUNIOR A. S. CORCINI, C.D. GHELLER, S. M. M. JARDIMA, R. D. LUCIA JR, T. STREIT JR, D. P. FIGUEIREDO, M. R. C. 2012b. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. Theriogenology, v. 78, p. 244-51.
- VARELA JUNIOR, A. S. CORCINI, C. D. ULGUIM, R. R. ALVARENGA, M. V. BIANCHI, I. CORRÊA, M. N. LUCIA, T. JR. DESCHAMPS, J. C.2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. Animal Reproduction Science, 115, 323-327.
- VIVEIROS, A. T. M. 2005. Criopreservação de sêmen de peixes. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16. Goiânia, GO. Palestras.

- VIVEIROS, A. T. M. ISAU, Z. A. CANEPPELEB, D. LEAL, M. C. 2012. Sperm cryopreservation effects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiforms). *Theriogenology*, 78, 803-810.
- VIVEIROS, A. T. M. *et al.* 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilodus (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74, 551-56.
- VIVEIROS, A. T. GODINHO, H. P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol and Biochem*, 35, 137–50.
- YAO, Z. RICHARDSON, G. CRIM, L. 1999. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*, 174, 183–93.
- YUKSEL, A. 2012. Genome Resource Banking of Biomedically Important Laboratory Animals. Publisher in *Theriogenology*, 78, 1653–1665.
- YUKSEL, A. 2012. Genome Resource Banking of Biomedically Important Laboratory Animals. Publisher in *Theriogenology*, 78, 1653–1665.
- WIIDT, D. E. 1992. Genetic resource banks for conserving wildlife species, examples and becoming organized on a global basis. Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam, *Animal Reproduction Science*, 28, 247-257.
- WOYNAROVICH, E. HORVÁTH, L. 2005. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq.

CAPÍTULO 1

“Manuscrito a ser submetido à revista **Aquaculture**”

Preservação *ex situ* de germoplasma do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)

Preservação *ex situ* de germoplasma do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887).

Adriano Rayol da Silva, Fernanda Pereira Alves, Sara Lorandi, Andreia Nobre Anciutti, Jorge Squeff Filho, Rodrigo Desessards Jardim, Carine Dahl Corcini, Juan Ramon Esquivel Muelbert, Juan Ramon Esquivel Garcia, Antonio Sergio Varela Junior*.

*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Bairro Carreiros - Fone (53) 3233.6500, Rio Grande – Rio Grande Sul, Brasil.

RESUMO

O *Piaractus mesopotamicus* devido sua alta rusticidade e importância econômica é uma das espécies nativas do Brasil mais estudadas em ecologia, biologia e na aquicultura. Todavia, técnicas como o congelamento espermático proporcionam inúmeros benefícios aplicáveis à reprodução de espécies nativas como o pacu. O presente estudo teve como objetivo verificar a eficácia de diferentes crioprotetores DMSO, glicerol e metanol, nas concentrações (5%; 7,5%; 10%; 12,5% e 15%) na criopreservação espermática do Pacu. Foram utilizados 14 machos selvagens de *P. mesopotamicus* aclimatados na propriedade, com peso entre 3 e 4,5 kg. Todos os tratamentos foram preparados em diluente BTS, contendo os diferentes crioprotetores. Todos os parâmetros da cinética celular foram avaliados pelo CASA, já a integridade de membrana, fluidez de membrana, índice de fragmentação de DNA, funcionalidade da mitocôndria, espécies reativas do oxigênio (EROS) e lipoperoxidação (LPO), foram avaliadas através de citometria de fluxo. O diluente com 7,5% de metanol apresentou motilidade total e progressiva maior que os demais tratamentos ($P < 0,05$), já no período de motilidade (PM) não houve diferença ($P > 0,05$) do tratamento com 5 % de metanol, entretanto as duas concentrações (5 e 7,5 % de metanol) foram superiores ($P < 0,05$) aos outros tratamentos. A velocidade média percorrida do tratamento com 7,5 % de metanol foi maior ($P < 0,05$) que os demais tratamentos, já a velocidade retilínea, distância média percorrida, distância curvilínea e retilínea foram maiores ($P < 0,05$) nos tratamentos com 7,5 e 10 % de metanol, não diferenciando entre si. O deslocamento lateral de cabeça foi menor ($P < 0,05$) em todas as concentrações dos tratamentos com metanol. O tratamento com 7,5 % de metanol esteve dentre os tratamentos com melhores resultados nas análises de integridade de membrana e funcionalidade de mitocôndria. Não houve diferença entre os tratamentos nas análises de fluidez de membrana e LPO. Portanto, indica-se o diluente BTS adicionado de 7,5 % de metanol na criopreservação espermática do Pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

Palavras-chaves: Congelamento; DMSO; espermatozoides; glicerol; metanol.

1. Introdução

O *Piaractus mesopotamicus* é representante da família dos peixes redondos de alto valor comercial no mercado brasileiro, possui alta rusticidade quando submetido ao cultivo e elevada importância econômica, pois sua carne é bastante apreciada pelos consumidores, sendo então uma das espécies alvo de estudos em ecologia, biologia, nutrição e aquicultura (JOMORI *et al.*, 2005). A criopreservação do esperma de Pacu pode ser utilizada como alternativa de preservação da diversidade genética *ex situ* e melhoramento zootécnico da espécie.

A demanda global por pescado tem sido impulsionada significativamente nas últimas décadas, devido principalmente ao crescimento da população e procura dos consumidores por uma alimentação mais saudável e de baixo custo. A aquicultura tem se mostrado uma possível alternativa na oferta de alimento para os próximos anos, tendo em vista que a pesca se apresenta estagnada desde os anos 90 (FAO, 2014a). Com a queda da captura de pescado, cresce a demanda pelo consumo de pescado proveniente de sistemas de produção aquícolas (TAL *et al.*, 2009).

Dados estatísticos da FAO, apontaram que a produção de pescado (peixes, algas, moluscos e crustáceos) provenientes da aquicultura atingiu 90,43 milhões de toneladas em 2012, o que exhibe crescimento acentuado e representatividade da produção total de pescado em escala mundial (FAO, 2015). Na produção continental nacional, o *Piaractus mesopotamicus* em 2011, representou em torno de 21.689,5 toneladas, contribuindo com 4% da produção brasileira, perdendo somente para o Tambaqui e para espécies exóticas (Tilápia e Carpa) (MPA, 2011).

Quanto mais a aquicultura se expande, cresce consequentemente a necessidade da aplicação de técnicas de reprodução para a criação de depósitos e otimização da produção. Neste contexto, a criopreservação de esperma tem sido utilizada como alternativa de preservação de recursos genéticos das unidades populacionais de diversas espécies de peixes que estão em perigo de extinção e ainda auxilia no melhoramento genético de plantéis (WAYMAN *et al.*, 1996).

O congelamento espermático proporciona inúmeros benefícios aplicáveis à reprodução (HOLT, 2000; FICKEL *et al.*, 2007), principalmente na formação de bancos de germoplasma, pois o frio prolonga o estado de anabiose das células e tecidos (MIES FILHO, 1987). Todavia a célula espermática sofre com as influências de variações específicas e individuais que a criopreservação proporciona (BAILEY AND ANDBUHR, 1995; STORNELLI *et al.*, 2005),

provenientes de diferenças biofísicas e bioquímicas das membranas das células espermáticas (HAFEZ AND HAFEZ, 2004). O sucesso desta técnica só é possível com a adição de um meio diluidor com a função de fornecer nutrientes ao espermatozoide e crioprotetores que possibilitem proteção às organelas celulares durante as fases de congelamento e descongelamento (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2010).

Em geral, os diluentes devem apresentar em sua formulação, carboidratos para fornecimento de energia; tampões, com capacidade de realizar o equilíbrio e estabilidade físico-química e antibióticos para não haver proliferação de microorganismos na amostra (PURDY, 2006a). Os diluentes também são carreadores de crioprotetores e estes dependendo da sua atividade são divididos em penetrantes e não penetrantes a célula.

Atualmente na criopreservação de esperma de peixes tem-se utilizado com resultados satisfatórios os crioprotetores penetrantes, sendo os mais comumente utilizados: alcoóis (dimetilsulfóxido; metilglicol; glicerol; metanol; etilenoglicol e propilenoglicol), e amidas (dimetilformamida, dimetilacetamida e metilformamida) (SALMITO-VANDERLEY, 2010; LEITE, 2011; VIVEIROS *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2012; VIVEIROS *et al.*, 2012). O uso de crioprotetores penetrantes minimiza os danos sobre as estruturas celulares, causados pelo congelamento e descongelamento espermático (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficácia dos crioprotetores penetrantes DMSO, glicerol e metanol, nas concentrações (5; 7,5; 10; 12,5 e 15% respectivamente), sobre a cinética e as organelas dos espermatozoides criopreservados de Pacu.

2. Materiais e Métodos

O presente estudo foi elaborado seguindo as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande – RS, segundo a portaria 0423/2016.

2.1. Captura dos animais e coleta do esperma

A coleta e o congelamento do esperma foram realizados em novembro-dezembro (período reprodutivo da espécie), na empresa de piscicultura Panamá LTDA, localizada no município de Paulo Lopes, Santa Catarina, Brasil.

Foram utilizados 14 machos selvagens de *P. mesopotamicus* aclimatados na propriedade, com peso entre 3 e 4,5 kg. Os indivíduos foram transferidos para tanques de polietileno de 1000L e permaneceram lá até o momento da retirada das amostras.

A coleta do esperma dos espécimes para o congelamento foi feita através de leves compressões abdominais (sentido crânio-caudal), tomando-se bastante cuidados para não haver ativação prévia ou contaminação das amostras por fezes, urina ou sangue. O esperma foi acondicionado em tubos cônicos de 15 mL (um por macho) e armazenados a 10° C. Os espécimes durante a extração espermática foram envoltos em toalha de algodão umedecida para evitar o estresse.

Após a coleta da amostra foi avaliada a motilidade espermática, descrito por Sorensen Jr. (1979), do esperma sem ativação e ativado. A análise sempre foi feita pelo mesmo técnico treinado, com microscópio de contraste de fases, usando 1µL de amostra com 4 µL de BTS foi verificado o esperma não ativado e também com 1 µL de amostra em 4 µL água destilada foi verificado a taxa de espermatozoides moveis, ambas análises foram realizadas sobre lâmina e coberto com lamínula. Foram descartadas as amostras que apresentaram contaminação prévia (movimento espermático na visualização do inativo) ou menos de 80% de motilidade (após ativação com água).

2.2.Criopreservação espermática

O congelamento contou com 15 tratamentos (DMSO, Glicerol e Metanol nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5 e 15%) por macho (14 animais diferentes), sendo este total duplicado, como forma de prevenção de perda de amostra durante o descongelamento, totalizando 420 palhetas. Todos os tratamentos foram preparados em diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*) que é constituído por 37,00 g de glicose; 6,00 g de citrato de sódio di-hidratado; 1,25 g de bicarbonato de sódio; 1,25 g de etileno diaminotetracetato e 0,90 g de cloreto de potássio em 1 L de água deionizada (PURSEL & JOHNSON, 1975) com pH de 7,2 e osmolaridade de 320 mOsm.

O material biológico coletado foi aliqotado em tubos cônicos de 1,5 mL contendo as soluções de congelamento diluindo-se na concentração final de 200 milhões de espermatozoides por mL de tratamento. Cada amostra foi envasada em palhetas de plástico de 250 µL, vedadas com álcool polivinílico, alocadas em *racks* de metal e mantidas resfriadas a 5° C durante 20 minutos, para maior eficiência dos crioprotetores sobre as amostras.

Depois de passado o tempo de contato entre esperma e tratamento, as raques foram transferidas para o canister do botijão de vapor de nitrogênio *dry shipper* (Taylor Wharton, modelo CP 300), permanecendo por 12 horas e em seguida foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (MVE, modelo CP-34), onde permaneceram até o momento do descongelamento para análise das amostras.

2.3.Avaliação pós-descongelamento

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 8s, sendo avaliada a cinética espermática (motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), período de motilidade (PM), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF)) e danos sobre as organelas citoplasmáticas (funcionalidade mitocondrial (FMit), integridade de membrana (IM), índice de fragmentação do DNA (DFI), fluidez de membrana (FM), peroxidação lipídica (LPO) e espécies reativas de oxigênio (EROS)).

A cinética espermática foi analisada no CASA (análise espermática computadorizada assistida, MedeaLab, Alemanha) através do software Sperm Vision® (Minitube).

Foram utilizados 0,1 µL de amostra e ativada em 4,0 µL de água destilada e observados em lâmina sob lamínula. Para obter-se os dados de cinética foram considerados vários campos, cada campo deveria apresentar no mínimo 50 células, totalizando no mínimo 1000 células no final da análise da amostra. Cada campo foi analisado entre 10 e 15 s após a ativação do esperma (DZIEWULSKA *et al.*, 2011).

As análises referentes aos danos sobre as organelas citoplasmáticas (funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana, fluidez de membrana, DFI, LPO e EROS), foram verificadas através do Citometro de Fluxo, modelo Attune Acoustic Focusing (Life Technologies) comportando lasers azuis (Argônio 488 nm) e violeta (UV 405 nm). Os dados foram obtidos através do software Attune® Cytometer software versão 2.1.0 (Life Technologies).

Para avaliar a funcionalidade de mitocôndria, integridade de membrana, fluidez de membrana, DFI, LPO e EROS foi analisado a dispersão dos eventos através do tamanho e complexidade (FSC x SSC) e utilizada a sonda fluorescente Hoechst 33342 (H342), na concentração de 16.2 mM, exceto para o DFI, sendo descartados os eventos (debris) negativos

para H3342 (PETRUNKINA *et al.*, 2010). Foram analisados 20.000 eventos por amostra, a uma taxa de fluxo de 100 µL/minuto.

2.4.Integridade da Membrana

A integridade da membrana plasmática foi avaliada seguindo a metodologia de Figueroa *et al.*, (2015), através de sonda fluorescente formada por Sybr14 e iodeto de propídio (IP) (Minitübe, Tiefenbach, Germany). A amostra (10 µL) descongelada foi incubada por 5 minutos com 0,25 µM de Sybr14 e 20 µM de IP. Os espermatozoides foram classificados como não lesados e com membrana funcional (Sybr + / IP-) e lesados e/ou com membrana não funcional (Sybr + / IP +; Sybr- / IP +; Sybr- / IP-).

2.5.Fluidiez da Membrana

A avaliação da fluidiez da membrana plasmática foi verificada por 2,7 µM do corante merocianina 540 (M540) e 0,1 µM de YoPro, acrescida de 10 µL de amostra incubada por 5 minutos. As células foram classificadas quanto à alta fluorescência (alta fluidiez) e baixa fluorescência (baixa fluidiez) (FERNÁNDEZ-GAGO *et al.*, 2013). A fluidiez foi calculada através do número de espermatozoides com baixa fluidiez/ número de espermatozoides com baixa fluidiez mais espermatozoides com alta fluidiez X100.

2.6.Funcionalidade da mitocôndria

A análise foi realizada através da fluorescência emitida pela Rhodamina 123 (HE-WOODS, 2004). Para a quantificação das populações foi utilizado 20 µM de Iodeto de propídio, 7,5 µM de Rodamina 123 na amostra e incubados por 10 minutos.

Os espermatozoides que exibiram alta fluorescência (grande acúmulo de rhodamina) foram classificados com funcionalidade mitocondrial alta e quando estavam com a fluorescência baixa (menor acúmulo de rhodamina) foram considerados com menor funcionalidade mitocondrial (GILLAN *et al.*, 2005).

2.7.Índice de Fragmentação do DNA

O índice de fragmentação do DNA foi quantificado através do ensaio da estrutura da cromatina (SCSA). Para esta avaliação, foram adicionados 5µL TNE e 10µL de Tritonem 10 µL de amostra descongelada, em intervalos de 30 segundos. O corante acridineorange, também foi adicionado e incubado por 30 s não ultrapassando o tempo de 2min, para fazer a leitura (JENKINS *et al.*, 2015).

Os espermatozoides foram classificados em DNA integro (verde) e fragmentado (laranja/vermelho) (JENKINS *et al.*, 2015). O índice de fragmentação de DNA foi calculado através do número de espermatozoides com DNA fragmentado/número de espermatozoides DNA integro + espermatozoides com DNA fragmentado.

2.8. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica dos espermatozoides foi avaliada logo depois de descongelados. Foi adicionada a concentração de 1µM de Bodipy C11 em 10 µL de amostra, e incubados por 5 minutos (background) e 2 horas (HAGEDORN *et al.*, 2012). A taxa de peroxidação lipídica foi calculada através da intensidade mediana de fluorescência verde (lipídio peroxidado) / intensidade mediana de fluorescência verde + intensidade mediana de fluorescência vermelha (lipídio não peroxidado) *100; descontado sempre o background.

2.9. Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Para esta avaliação foi utilizado 1,0 µM do diacetato de diclorofluoresceína '(H2DCFDA) (emite fluorescência verde quando oxidado) e 7,5 µM IP em 10 µL de amostra descongelada. A intensidade mediana da fluorescência verde foi utilizada apenas para espermatozoides vivos (IP-) (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO *et al.*, 2011).

2.10. Análises Estatística

As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, seguidas por análise de variância (ANOVA) por teste de Tukey. Os tratamentos foram considerados variáveis independentes, e os parâmetros MT, PM, MP, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, integridade de membrana, fluidez de membrana, FMit, DFI, ROS, peroxidação lipídica, foram considerados variáveis dependentes. Todas as análises foram feitas pelo software Statistix® 9.0 (Statistix 2008).

3. Resultados

Após o descongelamento foi observado que o metanol na concentração de 7,5 % apresentou os maiores resultados ($P < 0,05$) sobre a motilidade total e progressiva, em relação as suas demais concentrações e outros crioprotetores. O período de motilidade (PM) não diferiu ($P > 0,05$) entre as concentrações de 5, 7,5 e 10 % de metanol, entretanto, essas concentrações foram superiores ($P < 0,05$) as suas demais concentrações e outros tratamentos (Tab. 1).

Não foi possível resultados sobre a cinética espermática ao utilizar o crioprotetor glicerol nas concentrações 10, 12,5 e 15 % (Tab. 2).

A velocidade média do percurso dos tratamentos com 7,5 % e 10 % de metanol foram maiores ($P < 0,05$) que as demais concentrações e outros tratamentos. Já a velocidade retilínea (VSL), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL) e retilínea (DSL) também foram maiores ($P < 0,05$) nos tratamentos com 7,5 e 10 % de metanol, porém não diferenciaram entre si. O deslocamento lateral de cabeça (ALH) e a linearidade (LIN) foram menores ($P < 0,05$) em metanol quando comparados ao DMSO em todas as concentrações e glicerol na concentração de 5 % (Tabela 2).

O tratamento com 7,5 % de metanol esteve dentre os melhores tratamentos nas análises de integridade de membrana, funcionalidade de mitocôndria, entretanto apresentou os maiores valores LPO e EROS quando comparado aos demais crioprotetores (Tab. 1).

4. Discussão

O presente estudo é um dos pioneiros a utilizar a citometria de fluxo para quantificar os danos sobre as organelas celulares: integridade de membrana, fluidez de membrana, funcionalidade da mitocôndria, índice de fragmentação do DNA e peroxidação lipídica, na criopreservação espermática de Pacu.

Os álcoois têm sido amplamente utilizados no congelamento espermático de inúmeras espécies de peixes nativas do Brasil: Matrixã (*Brycon cephalus*) Ninhaus-Silveira *et al.* (2006), Pirapitinga (*Brycon nattereri*) Oliveira *et al.* (2007), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Menezes *et al.* (2008); Varela Jr *et al.*, (2012), Curimba (*Prochilodus lineatus*) Viveiros *et al.* (2009). E em relação a taxa de motilidade espermática pós-descongelamento, seus resultados apresentam-se diversificados e satisfatórios dentre as espécies citadas (68%, 51%, 20-25% e 38% respectivamente). Neste estudo a motilidade total foi de 30 % em 67 segundos.

Os primeiros estudos referentes a criopreservação espermática de pacu atentaram-se a motilidade progressiva subjetiva (CAROLSFELD *et al.*, 1990). Neste estudo o metanol 7,5% apresentou motilidade total, progressiva e período de motilidade acima do aceitável nas normas do colégio brasileiro de reprodução. Os autores Ribeiro e Godinho (2003) utilizaram o mesmo crioprotetor a uma concentração de 5% no congelamento espermático do piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) e obtiveram resultados aproximados ao deste estudo, obtendo motilidade progressiva (sem utilização do CASA) de 36, 7%, corroborando os resultados obtidos por nosso estudo.

A importância do resultado sobre a motilidade espermática se justifica, pois, a qualidade de espermatozoides móveis permite conveniência na inseminação artificial, mantendo assim a variabilidade genética para os programas de melhoramento de espécies para cultivo e na conservação de populações em ambiente natural (CAROSFELD *et al.*, 2003; VIVEIROS & GODINHO, 2009). Além disso, o movimento espermático proporciona a fertilização do oócito e conseqüentemente a perpetuação da espécie.

Varela *et al.*, (2012), realizou a criopreservação espermática do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) com diferentes concentrações de DMSO e foi comprovado que a concentração de 10% de DMSO, manteve melhor a qualidade dos espermatozoides. O DMSO é capaz de se ligar aos fosfolípidios da membrana, possibilitando o transporte de água em temperaturas abaixo do ponto de congelamento (-196°C), evitando assim formação dos cristais de gelo, já que há diminuição do ponto de congelamento dentro da célula (THIRUMALA *et al.*, 2006).

No presente estudo a concentração de 10% de DMSO apresentou resultado similares aos obtidos por Varela Junior *et al* (2012), entretanto o metanol foi superior ao DMSO em pacu.

Os resultados sobre a fluidez da membrana demonstraram que esta estrutura não perdeu sua capacidade seletiva durante o congelamento, devido os crioprotetores apresentarem alta permeabilidade as células. O glicerol, apesar de não conferir resultados satisfatórios sobre a motilidade, manteve a membrana celular íntegra e fluida, pois além de diminuir a pressão osmótica dentro da célula atua diretamente na membrana plasmática, pois seu arranjo estrutural exibe a sua capacidade de se ligar na cabeça dos fosfolípidios, reduzindo o influxo de água e interagindo com as ligações proteicas e glicoproteicas da célula da membrana (PARKS & GRAHAM, 1992). O metanol apresentou resultados satisfatórios na maioria dos parâmetros avaliados tanto da cinética quanto aos danos celulares, devido ao seu

baixo peso molecular é considerado o crioprotetor intracelular mais facilmente permeável à membrana plasmática (BEDORE, 1999).

Altas concentrações de DMSO, diminuem o rompimento da membrana celular, pois minimizam a entrada e a quantidade de água dentro da célula (desidratação), impedindo a formação de cristais de gelo e garantindo a integridade da membrana e mitocôndria (HE & WOODS, 2004). A estabilidade da membrana plasmática manteve a atividade da cadeia transportadora de elétrons (fosforilação oxidativa), produzindo ATP para geração de energia usada no batimento flagelar dos espermatozoides, que consequentemente, permitiu maiores taxas de motilidade. Se tratando da funcionalidade da mitocôndria, o DMSO nas concentrações 12,5; 15 % e metanol 12,5 % exibiram os maiores valores de atividade mitocondrial, entretanto o metanol foi superior quanto a motilidade em relação ao DMSO.

Todos os tratamentos conferiram índices baixos de fragmentação do DNA (<5%), exibindo que a integridade do DNA foi mantida durante o congelamento. Este resultado é corroborado por estudos feitos por Patryka *et al* (2010), com os quais deduz-se que a cromatina do espermatozoide é mais condensada que a encontrada nas células espermáticas em estados menos desenvolvidos (espermatogônias, espermatócito e espermátides), possibilitando menos riscos de lesão ao DNA, além disso, ela apresenta-se protegida pela membrana nuclear, o que garante sucesso na fecundação do oócito pelo espermatozoide (CABRITA *et al.*, 2010).

Os resultados demonstraram altas taxas de EROS no Metanol nas concentrações 7,5; 10 e 12 % e Glicerol a 10 %, isto demonstra uma relação direta com os altos níveis de LPO obtidos pelos mesmos tratamentos nas respectivas concentrações. O estresse oxidativo pode ocorrer passivamente durante a respiração celular, porém é importante considerar que a alta produção de EROS é resultado da preparação incorreta da concentração do diluente ou quando este entra em contato com o crioprotetor, sendo necessário considerar as fases estressantes do congelamento e descongelamento (KOPEIKA *et al.*, 2007).

Em decorrência disso, ocorreu aumento da atividade das EROS sobre os ácidos graxos da membrana plasmática (LAHNSTEINER *et al.*, 2009). Sendo assim, as membranas permaneceram menos fluidas quando comparados aos tratamentos com menos atividade de EROS, porém não interferiu sobre a integridade da membrana dos referidos tratamentos.

Um estudo onde realizaram a criopreservação espermática do Cará (*Geophagus brasiliensis*), a concentração de 5% de glicerol foi apontada como satisfatória no combate da produção das EROS (CALDAS *et al.*, 2014). Isto demonstra que o glicerol pode ser utilizado

em técnicas de criopreservação em concentrações de até 5%, pois em concentrações maiores ele pode ser tóxico aos espermatozoides, (MERYMAN, 1971; HAMMERSTEDT, 1992), podendo também prejudicar a integridade da membrana ao interferir na camada do glicocálix e no balanço energético da célula, impossibilitando motilidade ao espermatozoide (HAMMERSTEDT, 1992).

Um crioprotetor penetrante deve ser um componente que consiga entrar na célula por difusão passiva, desidratando a célula e protegendo-a contra a formação de cristais de gelo. Sua permeabilidade é dependente do seu baixo peso molecular (PURDY, 2006). Portanto, o metanol dentre os diferentes crioprotetores testados neste trabalho, é o que apresenta o menor peso molecular, o que conferiu maior velocidade de penetração desse composto nas amostras congeladas, evitando a formação das crioinjúrias e rompimento das estruturas celulares, garantindo sucesso da criopreservação espermática da espécie nativa *P. mesopotamicus*,

5. Conclusão

Indica-se a utilização do Metanol na concentração de 7,5% adicionado ao diluente BTS para criopreservação de pacu, pois garantiu mobilidade e integridade aos espermatozoides pós-descongelamento, demonstrando que este crioprotetor pode ser utilizado como ferramenta na conservação de germoplasma do *P. mesopotamicum*.

6. Referências

- Bailey, J.L., Buhr M.M., 1995. Regulation of internal Ca^{2+} by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology*, 32, 259-269.
- Bedore, A.G., 1999. Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 53 p.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M.P., 2010. Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol*, 26, 623–635.
- Carosfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni Filho, E., Harvey, B.J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63, 472-489.
- Dziewulska K, Rzemieniecki A, Czerniawski R, Domagała J. 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, 76: 300 –311.
- FAO., 2015. Global Aquaculture Production database updated to 2013 – Summary information. FAO: Rome, Italy.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014a). The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Roma: FAO. Acessado em 01 de agosto de 2017, as 12h00min.
- Fernández-Gago, R., Domínguez, J.C., Martínez-Pastor, F., 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, 80: 400–10.
- Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A., 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res*, 53, 81-89.
- Figueroa, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., Isachenko, E., Farias, J.G., Valdebenito, I., 2015. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, 83: 238–245.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29, 29-38.
- Hagedorn, M., McCarthy M., Carter, V.L., Meyers, S.A., 2012. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLoS ONE*, 7, 393-397.
- He, S., Woods, L.C., 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 48:254–62.
- Holt, W.V., Head, M.F., North, R.D., 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *BiolReprod*, 46, 1086-1094.
- Hugo, P.G., Vanessa, M.C.A., Marco, T.D.P., 2003. Cryopreservation of the Semen of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Cryoprotectants, Spermatozoa Activating Solutions and Cryogenic Refrigerator. *R. Bras. Zootec*, 32, 1537-1543.
- Jenkins, J.A., Draugelis-Dale, R.O., Pinkney, A.E., Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S, 2015. Flow cytometric method for measuring chromatin fragmentation in fixed sperm from yellow perch (*Perca flavescens*). *Theriogenology*, 83: 920–931.
- Kopeika, E., Kopeika, J., Zhang, T., 2007. Cryopreservation of Fish Sperm. In: JG Day, Stancey, GN. *Cryopreservation and freeze-Drying Protocols. Serie: Methodos in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 203-217.
- Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Martins, M.I.E.G., Portella, M.C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile e production in different rearing systems. *Aquaculture*, 175-183.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., Mc Niven, M.A., Richardson, G.F., 2009. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sêmen: Composition and effects on sperm functionality. *Aquaculture*, 298, 118 –24.
- Menezes, J.T.B., Queiroz, L.J., Doria, C.R.C., Menezes J.R.J.B., 2008. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amaz*, 38, 365-368.
- Meryman, H.T., 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8, 173–183.
- Mies Filho, A., 2005. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 783p.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2011. Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%203%ADstico%20MPA%202010.pdf. Acesso em ago. 2017.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R., Senhorini, J.A., 2006. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology Technology*, 49, 651-659.

1440 Oliveira, A.V., Viveiros, A.T.M., Maria, A.N., Freitas R.T.F., Isaú, Z.A., 2007. Sucesso do
1441 resfriamento e congelamento de sêmen em pirapitinga (*Brycon nattereri*). Arquivo
1442 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59, 1509-1515.

1443 Parks, J.E., Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.
1444 Theriogenology, 38, 209-222.

1445 Partyka, A., Nizanski, W., Lukas Zewicz, E., 2010. Evaluation of fresh and frozen-thawed
1446 fowl sêmen by flow cytometry. Theriogenology, 74, 1019-1027.

1447 Purdy, P.H.A., 2006. Review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 63,
1448 215-225.

1449 Ribeiro, R.I.M.A., Godinho, H.P., 2003. Testicular sperm cryopreservation of the teleost 'piauaçu'
1450 *Leporinus macrocephalus*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55 n.º.1 Belo Horizonte.

1451 Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Savignone, C.A., Stornelli, M.A., 2005. Efecto de
1452 los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Anal. acta Veterinaria, 25,
1453 28-35.

1454 Tal, Y., Schreier, H.J., Sowers, K.R., Stubblefield, J.D., Place, A.R., Zohar, Y.,
1455 2009. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. Aquaculture, 286,
1456 28-35.

1457 Thirumala, S., Campbell, W.T., Vicknair, M.R., Tiersch, T.R., Devireddy, R.V., 2006.
1458 Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped
1459 bass, *Morone saxatilis*. Theriogenology, 66, 964-973.

1460 Varela Junior, A.S., Goularte, K.L., Alves, J.P., Pereira, F.A., Silva, E.F., Cardoso, T.F.,
1461 Jardim, R.D., Streit Junior, D.P., Corcini, C.D., 2015. Methods of cryopreservation of
1462 Tambaqui sêmen, *Colossoma macropomum*. Animal Reproduction Science, 157, 71-
1463 77.

1464 Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Streit Jr, D.P., Rizzoto, G., Jardim, R.D., Lucia Jr, T.,
1465 Figueiredo, M.P.C., 2012. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do
1466 Dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de Tambaqui *Colossoma macropomum*.
1467 Atlântida, 34, 129-37.

1468 Viveiros, A.T., Godinho, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian
1469 freshwater fish species: a review. Fish Physiol and Biochem, 35, 137-50.

1470 Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R., 1996. Cryopreservation of sperm of spotted
1471 seatrout (*Cynoscion nebulosus*) Gulf Research Reports, 9, 183-188.

ANEXOS

Tabela 1. Avaliação da cinética espermática e citometria dos danos sobre as estruturas das células espermáticas do Pacu pós-descongelamento. Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

Trat	MT (%)	MP (%)	PM (s)	IntMemb (%)	FluidMemb (%)	FunciMito (%)	DFI (%)	LPO (%)	EROS (%)
DMSO 5%	10,0±0,7 ^{def}	6,8±0,6 ^{ef}	17,7±3,8 ^{def}	45,3±7,0 ^d	67,4±6,6 ^a	68,1±4,8 ^{abc}	0,05±0,006 ^c	46,5±4,5 ^a	2522,8±318,72 ^c
DMSO 7,5%	10,6±0,8 ^{de}	6,7±0,6 ^{ef}	18,4±4,3 ^{se}	56,8±3,8 ^{abcd}	48,9±7,1 ^a	69,0±6,0 ^{abc}	0,05±0,002 ^c	45,9±5,3 ^a	2116,1±238,67 ^c
DMSO 10%	7,8±0,6 ^{def}	4,2±0,5 ^{ef}	16,8±4,1 ^{def}	59,9±3,6 ^{abcd}	42,0±7,8 ^a	68,1±6,7 ^{abc}	0,04±0,004 ^c	46,9±5,1 ^a	4582,0±1262,3 ^c
DMSO 12,5%	9,3±0,8 ^{def}	4,8±0,6 ^{ef}	9,2±3,5 ^{efg}	69,0±4,1 ^{ab}	53,5±8,6 ^a	72,6±7,6 ^{ab}	0,06±0,007 ^c	50,0±4,9 ^a	2323,2±242,34 ^c
DMSO 15%	9,2±0,7 ^{def}	5,7±0,6 ^{ef}	12,8±3,5 ^{efg}	70,8±4,4 ^a	44,6±9,3 ^a	80,6±5,8 ^a	0,05±0,005 ^c	46,2±4,7 ^a	3319,9±620,68 ^c
Glicerol 5%	6,0±0,4 ^f	3,1±0,2 ^f	5,5±2,0 ^{fg}	45,5±7,3 ^d	59,3±9,5 ^a	57,8±7,4 ^{bcde}	0,07±0,01 ^{bc}	45,4±4,9 ^a	2404,2±211,01 ^c
Glicerol 7,5%	6,7±0,8 ^{ef}	4,6±0,7 ^{ef}	2,1±1,5 ^g	55,4±7,0 ^{abcd}	57,9±9,5 ^a	47,5±7,8 ^{de}	0,06±0,007 ^{bc}	40,9±4,7 ^a	2473,7±220,92 ^c
Glicerol 10%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	63,4±6,9 ^{abc}	49,3±9,5 ^a	48,9±8,0 ^{cde}	0,06±0,006 ^c	50,7±5,9 ^a	47072±25312 ^b
Glicerol 12,5%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	60,1±6,6 ^{abcd}	41,5±9,2 ^a	45,8±9,1 ^{de}	0,04±0,004 ^c	47,8±5,7 ^a	1984,8±168,68 ^c
Glicerol 15%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	59,1±6,8 ^{abcd}	52,8±9,2 ^a	44,7±7,5 ^{de}	0,05±0,007 ^c	39,9±5,4 ^a	1638,9±146,34 ^c
Metanol 5%	20,6±1,5 ^{bc}	14,5±1,3 ^{bc}	51,5±4,0 ^{ab}	58,6±6,6 ^{abcd}	49,1±10,4 ^a	61,7±9,1 ^{abcde}	0,07±0,01 ^{bc}	42,2±4,8 ^a	2653,5±311,11 ^c
Metanol 7,5%	30,1±1,4 ^a	22,1±1,3 ^a	67,6±7,4 ^a	54,7±6,3 ^{abcd}	48,2±9,1 ^a	68,4±7,6 ^{abc}	0,06±0,005 ^{bc}	48,0±4,6 ^a	48378±24723 ^{ab}
Metanol 10%	25,0±1,6 ^b	17,7±1,4 ^b	50,3±2,1 ^b	52,4±5,3 ^{bcd}	50,2±9,8 ^a	60,7±8,0 ^{abcde}	0,1±0,03 ^{ab}	53,0±3,5 ^a	23899±12197 ^c
Metanol 12,5%	17,6±1,4 ^c	11,7±1,1 ^{cd}	47,7±2,3 ^{bc}	48,1±7,1 ^{cd}	58,8±10,3 ^a	71,1±6,0 ^{ab}	0,06±0,008 ^{bc}	61,7±5,7 ^a	86049±39808 ^a
Metanol 15%	12,1±0,8 ^d	7,8±0,7 ^{de}	32,7±3,0 ^{cd}	49,6±5,4 ^{cd}	55,2±12,8 ^a	67,1±8,6 ^{abcd}	0,1±0,04 ^a	51,6±3,5 ^a	10908±4216,5 ^{bc}

*Tratamento (Trat), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), período de motilidade (PM), Integridade de membrana (IntMemb), Fluidez de membrana (FluidMemb), Funcionalidade de Mitocôndria (FunciMit), Índice de Fragmentação do DNA (DFI), peroxidação lipídica (LPO) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROS).

*Letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente (P < 0,05).

Tabela 2. Análise da cinética espermática dos diferentes tratamentos, DMSO, Glicerol e Metanol nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5; 15 % do esperma descongelado de *Piaractusmesopotamicus*. Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

Trat	DAP(µm)	DCL(%)	DSL	VAP(µm/s)	VCL(µm/s)	VSL(µm/s)	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
DMSO 5%	11,2±0,3 ^c	14,7±0,5 ^{dc}	8,7±0,2 ^c	26,1±0,8 ^{cde}	34,4±1,4 ^{cd}	20,4±0,6 ^{cde}	0,7±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^{abc}	0,7±0,0 ^{abc}	2,0±0,1 ^{bcd}	23,1±0,6 ^{ab}
DMSO 7,5%	10,3±0,2 ^{cde}	13,4±0,3 ^{def}	8,1±0,1 ^{cd}	24,1±0,5 ^{ef}	31,5±0,8 ^{de}	19,1±0,4 ^{ef}	0,8±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^{abc}	0,7±0,1 ^{abcd}	2,0±0,0 ^{cd}	23,6±0,6 ^a
DMSO 10%	9,7±0,2 ^{de}	12,7±0,4 ^{ef}	7,8±0,1 ^{cd}	22,8±0,6 ^{ef}	30,1±1,1 ^{de}	18,4±0,5 ^{ef}	0,8±0,1 ^a	0,6±0,0 ^{ab}	0,7±0,0 ^{abc}	1,9±0,0 ^{cde}	22,7±0,7 ^{ab}
DMSO 12,5%	9,4±0,2 ^e	11,7±0,3 ^f	7,3±0,1 ^d	22±0,6 ^f	27,4±0,8 ^e	17,1±0,4 ^f	0,7±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,8±0,1 ^a	1,9±0,0 ^{cdef}	19,8±0,8 ^b
DSMO 15%	10,1±0,2 ^{cde}	12,8±0,4 ^{ef}	7,9±0,1 ^{cd}	23,2±0,6 ^{ef}	29,7±1,0 ^{de}	18,2±0,4 ^{ef}	0,7±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^{ab}	0,7±0,1 ^{ab}	1,9±0,0 ^{cde}	23,0±0,7 ^{ab}
Glicerol 5%	10,8±0,3 ^{cde}	14,4±0,5 ^{de}	8,3±0,2 ^{cd}	25,4±0,8 ^{cdef}	33,8±1,3 ^{cd}	19,7±0,6 ^{cdef}	0,7±0,1 ^{ab}	0,6±0,0 ^{cd}	0,7±0,0 ^{abcd}	2,6±0,1 ^a	25,2±0,8 ^a
Glicerol 7,5%	10,2±0,3 ^{cdc}	13,3±0,4 ^{def}	8,2±0,2 ^{cd}	24,1±0,7 ^{ef}	32,0±1,3 ^{de}	19,3±0,5 ^{cdef}	0,8±0,1 ^a	0,6±0,1 ^a	0,7±0,0 ^{abc}	2,2±0,1 ^{ab}	25,3±1,0 ^a
Glicerol 10%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Glicerol 12,5%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Glicerol 15%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Metanol 5%	12,8±0,3 ^b	17,9±0,4 ^{bc}	10±0,2 ^b	28,8±0,7 ^{bc}	40,3±1,1 ^{ab}	22,4±0,6 ^{bc}	0,7±0,1 ^{ab}	0,5±0,0 ^d	0,7±0,0 ^d	1,5±0,0 ^{defg}	24,1±0,5 ^a
Metanol 7,5%	15,1±0,4 ^a	20,1±0,5 ^{ab}	11,7±0,3 ^a	33,1±0,8 ^a	44,2±1,1 ^a	25,7±0,7 ^a	0,7±0,01 ^{ab}	0,5±0,0 ^{cd}	0,7±0,0 ^{bcd}	1,4±0,0 ^g	24,7±0,4 ^a
Metanol 10%	14,7±0,3 ^a	20,5±0,6 ^a	11,3±0,3 ^a	32,1±0,8 ^{ab}	44,7±1,3 ^a	24,7±0,6 ^{ab}	0,7±0,1 ^b	0,5±0,0 ^d	0,7±0,0 ^{cd}	1,5±0,0 ^{fg}	25,7±0,5 ^a
Metanol 12,5%	12,7±0,3 ^b	17,6±0,5 ^c	9,9±0,2 ^b	28,0±0,6 ^{cd}	38,8±1,2 ^{abc}	21,9±0,5 ^{bcd}	0,7±0,1 ^{ab}	0,5±0,0 ^{cd}	0,7±0,0 ^a	1,5±0,0 ^{efg}	24,8±0,6 ^a
Metanol 15%	11,1±0,2 ^{cd}	15,5±0,6 ^{cd}	8,6±0,2 ^c	25,2±0,6 ^{cdef}	35,2±1,4 ^{bcd}	19,5±0,5 ^{cdef}	0,7±0,1 ^{ab}	0,5±0,0 ^{cd}	0,7±0,0 ^{bcd}	1,7±0,0 ^{defg}	24,4±0,7 ^a

*Distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF).

*Letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente (p < 0,05).