



Universidade Federal de Santa Catarina
Samira Freitas Costa



**Influência da taxa de descongelamento, da proporção de sêmen e da
solução diluidora para diferentes crioprotetores nos parâmetros
espermáticos do sêmen do suruvi
(*Steindachneridion scriptum*) crioconservado.**

Florianópolis
2016



Universidade Federal de Santa Catarina
Samira Freitas Costa



Influência da taxa de descongelamento, da proporção de sêmen e da solução diluidora para diferentes crioprotetores nos parâmetros espermáticos do sêmen do suruvi (*Steindachneridion scriptum*) crioconservado.

Projeto de pesquisa desenvolvido
como Trabalho de Conclusão de Curso, sob
orientação do professor Evoy Zaniboni-Filho.

Florianópolis
2016

Samira Freitas Costa

Influência da taxa de descongelamento e da proporção sêmen: solução diluidora para diferentes crioprotetores, nos parâmetros espermáticos do sêmen do suruvi (*Steindachneridion scriptum*) crioconservado.

Florianópolis, 11 de julho de 2016.

Profª Anita Rademaker Valença, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora

Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Giuliano Huergo
Co-orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc. Caio Cesar Magnotti
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de excelência oferecido.

Aos Professores e Mestres que compartilharam do bem mais valioso que poderiam oferecer, o conhecimento, em especial ao professor Evoy Zaniboni-Filho.

Aos pesquisadores Dr. Giuliano Huergo e Jhon Jimenez, por todo apoio e incentivo constante, pelo conhecimento transmitido, fundamental para que este trabalho se tornasse concreto, pela amizade e pelo crescimento profissional que acrescentou a minha jornada.

À família pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha caminhada, pelo zelo e por todo amor que sempre me dedicaram.

Aos amigos pela presença em todas as horas, mesmo que alguns distantes, sempre se fizeram presentes de alguma forma com palavras e gestos de carinho e incentivo.

A toda equipe do LAPAD, Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, chefia, professores, técnicos, funcionários terceirizados, colegas, amigos, pela confiança, por toda estrutura cedida, pelos profissionais de excelente qualidade que estão dispostos a ajudar sempre, pelo ambiente acolhedor desde minha primeira visita, pelo empenho em tornar realidade as minhas ideias.

Aos profissionais do LATRAAC- Laboratório da Tecnologia de Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis, Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela gentileza em disponibilizar informações e possibilitar a realização deste trabalho compartilhando conhecimento e disponibilizando os softwares de qualidade, em especial ao Prof. Robie Bombardelli, e ao pesquisador Giovano Neumann.

E a todos que contribuíram de alguma forma e que torceram para que esta etapa fosse concluída com êxito.

RESUMO

O presente estudo tem objetivo de contribuir com informações de relevância para elaboração de um protocolo de crioconservação para suruvi (*Steindachneridon scriptum*), que é uma espécie nativa, da Bacia do Prata e em risco de extinção (MMA, 2008). Foram avaliados diferentes fatores em duas etapas do experimento, onde a influência de duas soluções diluidoras e cinco taxas de descongelamento nos parâmetros espermáticos do sêmen do suruvi. Foram testadas na primeira etapa os efeitos de três diferentes taxas de diluição sêmen: solução diluidora, e em uma segunda etapa foi testado o efeito de três crioprotetores internos, distintos entre si.

A indução a espermição foi realizada de acordo com o protocolo de rotina. A coleta do sêmen em tubos de falcon foi feita por pressão abdominal. Foram formuladas soluções diluidoras, modificadas de Carolsfeld et al. (2003), utilizando diferentes combinações de crioprotetor externo e interno.

Para o experimento 1 foram utilizadas duas soluções diluidoras, a solução um (S1), composta por DMSO, gema de ovo, glicose e água destilada, e a solução dois (S2), composta por metanol, leite em pó desnatado, glicose e água destilada. Uma parte de sêmen fresco foi misturada a quatro partes de solução diluidora. A mistura foi envasada e congelada em palhetas de 0,5ml. Foram utilizadas cinco velocidades (°C/min.) de descongelamento (VA=648,0; VB=828,7; VC=1146,6; VD=1845,0 e, VE=4440,0). Foi utilizado um delineamento experimental de arranjo fatorial, com três fatores (Peixe (n=3), solução diluidora (n=2) e velocidade de descongelamento (n=5)). A análise foi realizada pelo teste da ANOVA ($\alpha=0,05$).

No experimento 2 foram testadas três soluções diluidoras, a solução A, composta por DMA, gema de ovo, glicose e água destilada, a solução B, composta por de DMSO, gema de ovo, glicose e água destilada, e a solução C composta por metanol, leite em pó desnatado, glicose e água destilada. As proporções sêmen: solução diluidora utilizadas para diluir o sêmen antes do congelamento foram de 1:2, 1:4 e 1:6. A mistura foi envasada e congelada em palhetas de 0,25ml. Para o descongelamento das amostras foi utilizada a taxa de descongelamento definida no experimento 1, VB=828,7 °C/min. Para análise estatística foi utilizado um delineamento experimental em arranjo fatorial, com três fatores (Peixe (n=5), solução diluidora (n=3) e proporção sêmen: solução (n=3)). A análise foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (KW) ($\alpha=0,05$).

Foi utilizado o software de Análise Espermática Computadorizada (CASA), que quantifica os seguintes parâmetros espermáticos: Motilidade (MOT) (%), velocidade curvilinear (VCL) ($\mu\text{m/s}$), velocidade média de deslocamento (VAP) ($\mu\text{m/s}$) e velocidade em linha reta (VSL) ($\mu\text{m/s}$).

No experimento 1 os valores médios obtidos para motilidade (MOT) apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) apenas entre os níveis do fator taxas de descongelção, o sêmen descongelado a uma taxa de $828,7\text{ }^{\circ}\text{C/min}$. apresentou o maior valor médio de MOT $24,7\pm 8,9\%$. Os valores médios de VMD e VLR foram diferentes ($p<0,05$) entre as soluções diluidoras, com médias para VMD de $33,88\pm 0,8\text{ }\mu\text{m/s}$ para o DMSO e $45,02\pm 1,94\text{ }\mu\text{m/s}$ para o metanol, enquanto que a média da VLR foi de $31,51\pm 0,81\text{ }\mu\text{m/s}$ para o DMSO e $42,56\pm 1,95\text{ }\mu\text{m/s}$ com o metanol. A VCL foi entre os fatores testados, semelhante.

No experimento 2 a MOT apresentou diferença significativa ($p<0,05$) entre os peixes. E a motilidade média das amostras crioconservadas com metanol foram mais altas em relação às demais soluções utilizadas. Já as velocidades espermáticas, VCL, VMD e VLR foram influenciadas significativamente ($p<0,05$) pelos crioprotetores utilizados, apresentando maiores valores para solução diluidora produzida à base de DMA.

Palavras chave:

Suruvi, taxa descongelção, sêmen crioconservado, DMA, DMSO, metanol.

ABSTRACT

This study has aimed to contribute relevant information to prepare a cryopreservation protocol for suruvi (*Steindachneridon postscript*), which is a native species, the La Plata Basin and at risk of extinction (MMA, 2008). They evaluated different factors in two stages of the experiment, where the influence of two solutions dilutive five thawing rates in sperm parameters of suruvi semen. In the first step they were tested the effects of three different dilution rates semen: diluting solution, and in a second step was tested the effect of three internal crioprotectores, distinct from each other.

The induction spermiation was performed according to the routine protocol. The semen collection in falcon tubes was made by abdominal pressure. Were formulated dilutive solutions, modified Carolsfeld et al. (2003), using different combinations of external and internal cryoprotectant.

For experiment 1 were used two diluting solutions, one solution (S1) consisting of DMSO, egg yolk, glucose and distilled water, and the two solution (S2) comprising methanol, skimmed milk powder, glucose and water distilled. A piece of fresh semen was mixed with four parts diluting solution. The mixture was bottled and frozen in 0.5 ml straws. five speed were used ($^{\circ}\text{C} / \text{min.}$) Defrost ($\text{VA} = 648.0$; $\text{VB} = 828.7$; $\text{VC} = 1146.6$; $\text{VD} = 1845.0$ and $\text{VE} = 4440.0$). an experimental design factorial arrangement was used, with three factors (Fish ($n = 3$), diluting solution ($n = 2$) and thawing rate ($n = 5$)). The analysis was performed by ANOVA test ($\alpha = 0.05$).

In experiment 2 were tested three diluting solutions, solution A consisting of DMA, egg yolk, glucose and distilled water, solution B, consisting of DMSO, egg yolk, glucose and distilled water, and solution C comprises methanol, skimmed milk powder, glucose and distilled water. Semen proportions: diluting solution used for diluting the sperm before freezing were 1: 2, 1: 4 and 1: 6. The mixture was bottled and frozen in 0.25 ml straws. For thawing the samples was used thawing rate set in experiment 1, $\text{VB} = 828.7$ $^{\circ}\text{C} / \text{min.}$ Statistical analysis was performed using an experimental design in factorial arrangement with three factors (Fish ($n = 5$), diluting solution ($n = 3$) and proportion semen: solution ($n = 3$)). The analysis was performed by Kruskal-Wallis test (KW) ($\alpha = 0.05$).

We used the computerized Sperm Analysis software (CASA), which quantifies the following sperm parameters: Motility (MOT) (%), curvilinear velocity (VCL) ($\mu\text{m} / \text{s}$), average speed (VAP) ($\mu\text{m} / \text{s}$) and straight-line speed (VSL) ($\mu\text{m} / \text{s}$).

In experiment 1, the average values for motility (MOT) showed significant differences ($p < 0.05$) between the levels of factor thawing rates, thawed semen to a 828.7 ° C rate / min. It had the highest average value of MOT $24.7 \pm 8.9\%$. The average values of VMD and VLR were different ($p < 0.05$) between the dilutive solutions, with averages for VMD 33.88 ± 0.8 um / s for DMSO and 45.02 ± 1.94 um / s for methanol, whereas the VLR average was 31.51 ± 0.81 um / s for DMSO and 42.56 ± 1.95 um / s with methanol. The VCL was among the tested similar factors.

In experiment 2 MOT significant difference ($p < 0.05$) between the fish. And the average motility of cryopreserved samples with methanol were higher compared to other solutions used. Already sperm speed, VCL, VMD and VLR were influenced significantly ($p < 0.05$) by cryoprotectants used, with higher values for diluting solution produced DMA base.

Key words:

Suruvi, thawing rate, semen cryopreserved, DMA, DMSO, methanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxas de descongelamento ($^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) obtidas pela imersão dos pallets de sêmen em diferentes temperaturas.....	19
Figura 2: Valores Médios de MOT do sêmen de suruvi após submetido a diferentes taxas de descongelamento.....	23
Figura 3: Valores médios de VMD ($\mu\text{m}/\text{s}$) do sêmen de suruvi pós-descongelamento para as diferentes soluções diluidoras utilizadas.....	24
Figura 4: Valores médios de VLR ($\mu\text{m}/\text{s}$) do sêmen de suruvi pós-descongelamento para as diferentes soluções diluidoras utilizadas.....	24
Figura 5: Valores de MOT (Média \pm desvio padrão) do sêmen de cada exemplar de suruvi testado.....	27
Figura 6: Valores médios de MOT do sêmen de suruvi com as soluções diluidoras testadas.....	27
Figura 7: Valores médios de VCL ($\mu\text{m}/\text{s}$) para cada solução diluidora testada.....	28
Figura 8: Valores médios de VMD ($\mu\text{m}/\text{s}$) para cada solução diluidora testada.....	29
Figura 9: Valores médios de VLR ($\mu\text{m}/\text{s}$) para cada solução diluidora testada.....	29
Figura 10: Resultados para MOT, testadas entre as três diferentes diluições pós-descongelamento.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das soluções diluidoras e proporções utilizadas para avaliar a taxa de descongelamento.....	18
Tabela 2: Temperatura da água de imersão, duração da imersão e taxas de descongelamento das amostras.....	19
Tabela 3: Valores de referência do sêmen de <i>S. scriptum</i> usados para configuração do software para análise de imagem	20
Tabela 4: Composição das soluções diluidoras e concentrações utilizadas para congelamento das amostras no experimento 2.	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.2 OBJETIVO GERAL	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 Experimento 1:	18
2.2 Experimento 2:	22
3. RESULTADOS.....	25
3.1 Experimento 1	25
3.2 Experimento 2	27
4. DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

Enquanto congelamento do sêmen de peixes teve sucesso na década de 1950 (BLAXTER, 1953), no Brasil os estudos sobre criopreservação começaram a ser desenvolvidos na década de 1980 (KAVAMOTO et al., 1989), apesar disso foram realmente intensificados a partir da década de 1990, como estratégia de conservação frente ao crescente número de usinas hidrelétricas e degradação que a construção de barragens para este fim demanda (CAROLSFELD et al., 2003). Atualmente já é viável para conservação de gametas de diversas espécies, e se faz cada vez mais necessária devido à rápida perda na viabilidade dos gametas apenas algumas horas após a espermição, exigindo um uso rápido para que não perca sua capacidade de fertilização. A fisiologia espermática varia muito de espécie para espécie e exige que o protocolo ideal seja ajustado de forma a produzir bons resultados. Desta forma torna-se imprescindível o desenvolvimento de técnicas que prolonguem a viabilidade dos gametas, o que atualmente é feito basicamente através de refrigeração e congelamento em nitrogênio líquido, aumentando o tempo de uso para dias, meses e até anos. Este prolongamento no tempo de uso do sêmen tem o intuito de aumentar a sua viabilidade de uso e acarreta outras vantagens como:

- favorece a sincronia entre ovulação e espermição dos reprodutores durante o manejo de indução hormonal.

- redução de custos e maior facilidade para aplicação de programas de seleção e melhoramento genético (HARVEY e CAROLSFELD, 1993; CARNEIRO, 2007).

- a implantação de bancos de sêmen criopreservado que permitam a manutenção da viabilidade genética de estoques selvagens e/ou linhagens selecionadas para uso na aquicultura (HARVEY & CAROLSFELD, 1993; ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004).

- disponibilidade de gametas o ano todo, contribuindo para programas de melhoramento genéticos (THIERSCH et al., 2007; VIVEIROS et al., 2012) tornando-a uma forma de manter estoques genéticos de populações que futuramente podem vir a não ser mais encontradas na natureza.

O crescimento da aquicultura, conseqüentemente aumenta também os efeitos negativos dessa atividade no ambiente aquático e no componente genético das espécies (BERT, 2007). A piscicultura brasileira ainda é realizada com peixes de baixa qualidade genética, falta de programas de melhoramento genético e de critérios para a hibridação intraespecífica (CHAMMAS, 2008). Somada a esses aspectos, a grande diversidade de peixes

presente nas bacias hidrográficas brasileiras (REIS et al., 2003) e a necessidade da conservação genética da mesma (GREER & HARVEY, 2004), revelam um grande desafio para o crescimento sustentável da aquicultura no Brasil. Constantemente se fazem novas descobertas sobre a variabilidade genética em populações de muitas espécies de peixes, e cada vez mais se fazem necessárias ações de conservação dos estoques naturais da espécie, preservando sua variabilidade genética.

Este estudo tem por objetivo produzir informações que contribuam para formulação de um protocolo de criopreservação para a espécie, popularmente conhecida como suruvi ou bocudo (*Steindachneridion scriptum*) (Siluriformes: Pimelodidae) da bacia do rio Uruguai (ZANIBONI-FILHO et al., 2004). Considerada uma espécie ameaçada de extinção (MMA, 2008), o suruvi *S. scriptum* é capturado com frequência na área de abrangência do reservatório de Itá. Além disso, apresenta redução populacional nos trechos lânticos dos reservatórios hidrelétricos do Alto Rio Uruguai (BEUX e ZANIBONI FILHO, 2008).

Com o desenvolvimento do protocolo de criopreservação para o *S. scriptum* será possível comparar taxas de motilidade, sobrevivência, velocidade e capacidade de fertilização do sêmen descongelado, informações que não são encontradas na literatura atual e que desperta interesse da comunidade acadêmica e cadeia produtiva por se tratar de uma espécie nativa da bacia do rio Uruguai e em risco de extinção (MMA, 2008). Nas últimas décadas os bancos genéticos *in vitro* para animais e plantas se popularizaram no mundo, devido principalmente a necessidade de sua conservação frente à perda progressiva da biodiversidade global. O germoplasma dos peixes é conservado na forma de sêmen mantido em nitrogênio líquido a -196°C , o que acarreta danos que ainda necessitam serem melhor estudados e avaliados, fatores como formação de cristais interna e externamente, estresse osmótico e oxidação implicam em mudanças na estrutura bioquímica e fisiológica, tais como inativação de enzimas, alterações iônicas, produção de radicais livres, rupturas na membrana plasmática, alterações na membrana mitocondrial entre outros danos observados nas estruturas e organelas celulares. Assim, o estudo das formas mais adequadas de crioconservação do sêmen de peixes, visa aumentar a viabilidade do mesmo para uso na conservação genética e aquicultura.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

A motilidade das células espermáticas, fundamental para determinar a capacidade de fertilização, é um dos parâmetros mais usados para avaliar a qualidade do sêmen em muitas espécies, e depende de diversos aspectos da célula, como estado fisiológico das mitocôndrias, produção de ATP, plasma, integridade dos canais de membrana e estrutura do flagelo após o descongelamento (FIGUEROA et al., 2016). Em estudos mais específicos há um enfoque no efeito da criopreservação na atividade das mitocôndrias, pois desempenham um papel fundamental na produção de ATP, através do mecanismo de fosforilação oxidativa, que está relacionado com as diferentes vias metabólicas que ocorrem no interior da mitocôndria (COSSON et al., 2008). As mitocôndrias estão ativamente envolvidas em outros processos como geração de radicais livres, apoptose e sinalização de cálcio. Além disso, ativação de movimento flagelar desempenha um papel fundamental na mobilidade do espermatozoide para fertilização.

Os espermatozoides necessitam da adição de substâncias com ação crioprotetora para seu congelamento adequado (SUQUET et al., 2000), pois o processo de descongelamento envolve uma reidratação das células devido ao influxo de água para seu interior, que deve ser rápido para evitar a recristalização (reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo que são letais para as estruturas da célula).

As soluções diluidoras são soluções de sais ou de carboidratos adicionados ao sêmen, cuja função é manter a estrutura das células espermáticas durante a redução da temperatura envolvida no processo de congelamento. Os componentes constituintes de um meio diluidor são importantes para assegurar o pH, a força iônica, os tipos de íons e a pressão osmótica do sêmen de cada espécie, por isso há uma diversidade de escolhas possíveis, onde a solução diluidora deve se enquadrar nas seguintes condições exigidas para um resultado eficaz: ser isotônico, para que não ative a motilidade, ser estável durante o armazenamento, e ser estéril para não veicular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas (LEGENDRE & BILLARD, 1980; CHAO, 1991).

O crioprotetor intracelular deve ser uma substância química não tóxica, capaz de retirar água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo. Comumente são utilizados como crioprotetores internos substâncias como: Dimetilsulfóxido (DMSO), dimetil acetamida (DMA), glicerol, metanol,

etileno glicol, metil glicol, propileno glicol. Os crioprotetores internos comumente utilizados estão descritos abaixo:

a) DMA (Dimetilacetamida): Composto orgânico, miscível em água, e que apresentou bons resultados ao ser utilizado para bagre africano (HORVART e URBÁNY, 2000), porém demonstrou alta toxicidade quando utilizado para o sêmen de tilápia nilótica (AMORIM, 2002).

b) DMSO (Dimetilsulfóxido): Composto derivado da lignina, substância responsável pela rigidez das células vegetais, é o crioprotetor mais utilizado para preservar células espermáticas em peixes de água doce (LEUNG, 1991), porém quando usado em concentrações ou períodos de estabilização elevados provoca redução na qualidade do sêmen (BEDORE, 1999).

c) METANOL: Substância que mais facilmente atravessa a membrana celular, por ter menor peso molecular em comparação ao DMA e DMSO, porém não há estudos relatando que os compostos envolvidos nas soluções diluidoras necessitam de fato permear as células para serem eficazes (VIVEIROS, 2011).

Já o crioprotetor extracelular reveste a célula externamente e estabiliza sua membrana, diminuindo os danos do congelamento, além de funcionar como fonte de nutrientes. Entre os crioprotetores extracelulares mais usados estão os açúcares (glicose, sacarose), que atuam na desidratação da célula, reduzindo os danos causados pela cristalização do gelo. A glicose é um diluidor de fácil acesso e, em combinação com DMSO e a gema de ovo, ou com metil glicol tem sido a mais utilizada em espécies de peixes de ordem characiformes no Brasil (VIVEIROS & GODINHO, 2008). A glicose atua ainda no aumento da pressão osmótica da solução, evitando a ativação dos espermatozoides. As proteínas como leite desnatado e gema de ovo, por exemplo, são utilizadas apresentarem ação crioprotetora, contendo ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação dos espermatozoides (CAROLSFELD et al., 2003), são adicionadas apenas antes do uso da solução. Sua ação crioprotetora se dá devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação.

A razão da mistura sêmen: ativador a ser utilizada varia entre as espécies e de acordo com a concentração espermática desejada. Uma diluição relativamente alta é necessária simultaneamente ao início da motilidade em 100% das células espermáticas (GODINHO,

2000). Em baixas diluições somente alguns espermatozoides são ativados, enquanto outros têm sua ativação tardia, o que se dá devido à diluição insuficiente ou à mistura inadequada da solução ativadora com o sêmen (BEDORE, 1999).

O descongelamento de sêmen de peixe envolve uma reidratação das células devido ao influxo de água para o seu interior (HOLT, 2000). O descongelamento rápido é necessário para evitar a recristalização (reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo que são letais para as células) (LEUNG, 1991). A taxa de descongelamento é um fator importante no processo de criopreservação, pois células que foram protegidas com um crioprotetor e resfriadas na taxa correta ainda podem morrer se forem descongeladas muito rapidamente ou muito lentamente (CAROLSFELD & HARVEY, 1999) e, em função disso diferentes compostos têm sido testados como solução diluidora, com a finalidade de proteger a estrutura dos espermatozoides tanto interna quanto externamente, partindo do princípio que devem estar viáveis ao serem descongelados.

Atualmente é comum o uso de softwares para a análise da qualidade espermática, o mais relatado na literatura consultada é o CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), obtido facilmente na internet, pois se trata de um software livre. O programa avalia cerca de 12 parâmetros, para estimar a motilidade, por exemplo, considera a percentagem de espermatozoides móveis, duração da motilidade e velocidade ($\mu\text{m/s}$), além do movimento progressivo, amplitude da onda flagelar e/ou padrão de motilidade (COSSON et al., 2008). De todos os parâmetros considerados por diversos autores para determinar a capacidade reprodutiva e de fertilidade de células espermáticas, tem sido recomendado avaliar o percentual de células móveis, a motilidade espermática, bem como o vigor ou velocidade espermática, visto que apresentam uma relação direta com as taxas de fertilização em peixes de água doce (GLOGOWSKI et al., 2002; URBANYI et al. 1999; TUSET et al., 2008). Porém os resultados destas análises podem ser influenciados por fatores externos e até mesmo devido a erro humano. Para minimizar estes erros de análise, métodos computadorizados comumente utilizados para avaliar atividade espermática de animais terrestres têm sido adaptados para análises em peixes (RAVINDER et al., 1997; TOTH et al., 1995).

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de diferentes velocidades de descongelamento e de proporção sêmen: solução diluidora de diferentes crioprotetores nos parâmetros espermáticos do suruvi, de forma a contribuir para o desenvolvimento de um protocolo de crioconservação de sêmen para a espécie em estudo.

1.2.1 Objetivos Específicos

1. Identificar a taxa de descongelamento que produz a maior viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento das amostras crioconservadas.
2. Avaliar o efeito de diferentes soluções diluidoras e taxas de diluição sobre a viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento das amostras crioconservadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas, ambas realizadas no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/UFSC), utilizando peixes provenientes de viveiros de terra escavados, do Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú (CEPC) da Empresa de Pesquisa e Extensão Agrícola do estado de Santa Catarina (EPAGRI), situados na cidade de Camboriú, Santa Catarina.

Este estudo usará como base, para comparar a influência das soluções diluidoras nos parâmetros espermáticos uma literatura comumente utilizada por outros trabalhos da área, onde congelamento de sêmen tem por finalidade promover a manutenção e o fornecimento de material genético, visando aumentar e preservar a variabilidade de uma determinada população.

2.1 Experimento 1:

Influência da taxa de descongelação nos parâmetros espermáticos do suruvi (*S. scriptum*) utilizando diferentes soluções diluidoras.

Na primeira etapa foram testadas cinco diferentes velocidades de descongelação, utilizando duas diferentes soluções diluidoras. Foram utilizados três machos de geração F1, mantidos em sistema de recirculação nos dias que antecederam o experimento, com a qualidade da água monitorada constantemente e com valores médios de: temperatura de 26,1°C, salinidade de 3,72mg/L, pH de 7,25, e 6,21mg/L de oxigênio dissolvido. Os peixes foram induzidos a espermição por meio de uma injeção intramuscular de Extrato de Pituitária de Carpa (EPC), de acordo com o método descrito por Weingartner et al., 2003. Foi aplicada uma dose, de 4mg EPC/kg peixe, e após 210 graus-hora a coleta do sêmen foi feita por pressão abdominal, de forma a evitar a contaminação por urina e fezes, e o sêmen foi armazenado de tubos de falcon.

A qualidade do sêmen fresco foi analisada ao microscópio logo após sua retirada para verificação se o mesmo se encontrava em condições mínimas recomendadas para os testes (VIVEIROS E GODINHO, 2009). A avaliação do sêmen *in natura* foi realizada utilizando uma alíquota de 10µL de sêmen, colocada em uma lâmina histológica de vidro, homogeneizada com 40µL de água destilada (MILIORINI, 2006).

Para esta etapa do experimento foram preparadas duas soluções diluidoras modificadas de Carolsfeld et al. (2003), descritas na Tabela 1. As soluções diluidoras testadas nesta parte foram à solução um (S1), composta por DMSO, gema de ovo de galinha, glicose e água destilada, e a solução dois (S2), composta por metanol, leite em pó, glicose e de água destilada. A proporção usada foi de uma parte de sêmen fresco misturada a quatro partes de solução diluidora (1:4).

Tabela 1. Composição das soluções diluidoras e concentrações utilizadas para avaliar a taxa de descongelamento.

Diluidor	Crioprotetor Interno	Crioprotetor Externo	Proporções de crioprotetores e água utilizada no diluidor	Proporção Sêmen: Solução Diluidora
1	DMSO	Gema de ovo+Glicose	15 ml DMSO, 1gema, 7,5g glicose, 135 ml de água destilada	1:4
2	METANOL	Leite em pó+Glicose	10 ml metanol, 5g leite em pó, 10g glicose, 100 ml de água destilada	1:4

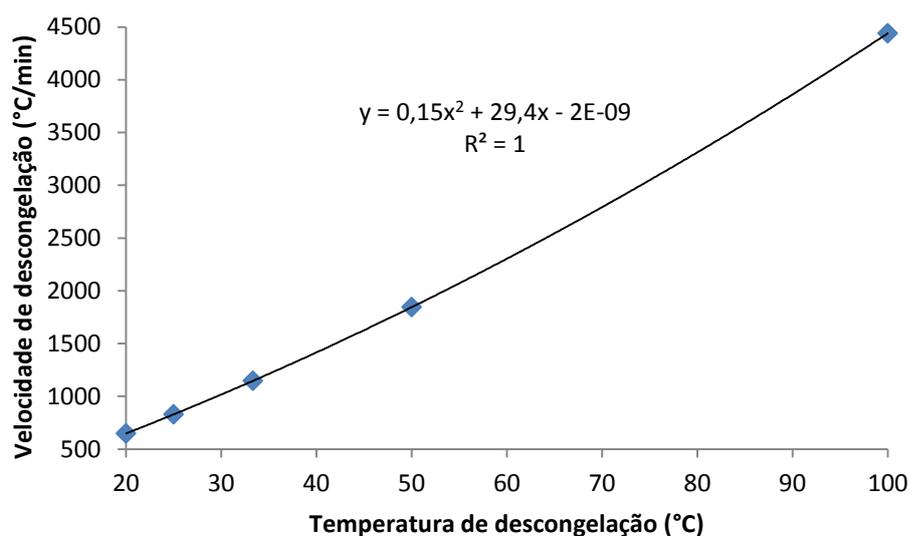
Fonte: Soluções diluidoras modificadas de Carolsfeld et al. (2003).

O armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas foi feito de forma que o mesmo não fosse ativado, evitando imprescindivelmente o contato com a água ou possíveis contaminações, como urina e/ou fezes do peixe durante a extração. O sêmen, após a diluição nas soluções diluidoras correspondentes foi colocado, primeiro em vapor de nitrogênio (dry-shippers), para que os espermatozoides fossem submetidos ao congelamento gradual e as estruturas membranosas não fossem muito alteradas, antes de serem estocadas a -196°C , depois de 30 minutos. Cada amostra foi armazenada em palhetas (pallets) de 0,5ml, identificadas individualmente, acondicionadas em um botijão de nitrogênio líquido (TAYLOR-Warton, modelo CP300) a -196°C . O descongelamento foi feito pela imersão das palhetas em água a cinco diferentes temperaturas de modo a induzir distintas velocidades de descongelamento. Na tabela 2 e na figura 1 podem ser observadas as taxas de descongelamento utilizadas, que foram calculadas levando em consideração a temperatura inicial da amostra (-196°C), a temperatura de descongelamento ($^{\circ}\text{C}$) e o tempo de imersão da amostra na água (minuto).

Tabela 2: Temperatura da água de imersão, duração da imersão e taxas de descongelamento das amostras.

Taxa de Descongelção	°C	Minutos	(°C/min.)
VA	20	0,33	648,0
VB	25	0,27	828,7
VC	33,3	0,20	1146,6
VD	50	0,13	1845,0
VE	100	0,07	4440,0

Figura 1: Taxas de descongelção (°C/min.) obtidas pela imersão dos pallets de sêmen em diferentes temperaturas



Para cada temperatura de descongelamento foram usadas três (3) amostras, sendo três repetições para cada solução diluidora testada. A captura dos vídeos foi realizada com uma objetiva de 10x, iniciando aos dois minutos (120 segundos) após o descongelamento, mesmo momento em que o sêmen foi ativado com uma solução de NaHCO_3 a 1% na proporção de 1:50 (amostra crioconservada: solução ativadora). Fragmentos de 15 segundos de cada vídeo (135 a 150 segundos pós-ativação) foram analisados por meio do programa computacional *ImageJ* no qual foi instalado o *plugin CASA (Computer-assisted sperm analysis)*.

Foram considerados os resultados produzidos pelo *CASA* para os seguintes parâmetros espermáticos: Motilidade (MOT) (%), velocidade curvilinear (VCL) ($\mu\text{m/s}$), velocidade

média de deslocamento (VAP) ($\mu\text{m/s}$) e velocidade em linha reta (VSL) ($\mu\text{m/s}$). Esses valores foram comparados com valores de referência obtidos a partir da análise de sêmen *in natura* determinados e que são obtidos individualmente para a espécie de interesse. Esses valores de referência foram cedidos pelo LATRAAC (Laboratório da Tecnologia de Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Tabela 2).

Tabela 3: Valores de referência do sêmen de *S. scriptum* usados para configuração do software para análise de imagem.

Característica*	Valor
Tamanho mínimo do espermatozoide (pixels)	2
Tamanho máximo do espermatozoide (pixels)	40
Distância mínima percorrida (quadros)	100
Velocidade máxima dos espermatozoides entre os quadros (pixels)	5
VSL mínima para espermatozoides móveis ($\mu\text{m/s}$)	2
VAP mínima para espermatozoides móveis ($\mu\text{m/s}$)	8
VCL mínima para espermatozoides móveis ($\mu\text{m/s}$)	10
Menor VAP ($\mu\text{m/s}$)	5
Percentual máximo de deslocamento com VAP nula	1
Percentual máximo de deslocamento com VAP baixa	30
Menor VAP 2 ($\mu\text{m/s}$)	20
Menor VCL ($\mu\text{m/s}$)	20
Maior WOB (percentual VAP/VCL)	80
Maior LIN (percentual VSL/VCL)	80
Maior WOB 2 (percentual VAP/VCL)	50
Maior LIN 2 (percentual VAP/VCL)	60
Taxa de mudança de quadros (quadros por segundo)	100
Microns por 1000 pixels	925,93

*Definida pelo programa computacional CASA.

Foi utilizado um delineamento experimental com arranjo fatorial, com três fatores peixes (n=3), solução diluidora (n=2) e taxa de descongelamento (n=5).

Cada parâmetro espermático, após a transformação logarítmica nos dados que se fizeram necessários, foi submetido à ANOVA e teste Tukey ($\alpha=0,05$). Os peixes foram manipulados de acordo com o protocolo código PP00788 aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 Experimento 2: Efeitos da diluição sêmen: solução diluidora para diferentes crioprotetores nos parâmetros espermáticos do suruvi (*S. scriptum*).

A segunda parte do experimento avaliou os efeitos de três concentrações de soluções diluidoras elaboradas a partir de diferentes crioprotetores. Foram utilizados cinco machos com peso médio de $1,75 \pm 0,23$ Kg, de geração F1, aclimatados em sistema de recirculação, com temperatura constante de $25,4^{\circ}\text{C}$, salinidade de $2,01\text{mg/L}$, $\text{pH} = 7,69$ e oxigênio dissolvido em $4,5\text{mg/L}$. A indução a espermição foi realizada por meio de uma injeção intramuscular de Extrato Hipofisário de Carpa (EPC), de acordo com o método descrito por Weingartner et al., 2003. Foi aplicada uma dose de $4,0\text{ mg}$ de EPC/kg de peixe, com monitoramento periódico da temperatura da água. A coleta do sêmen foi feita por pressão abdominal, e após 210 graus-hora, de forma a evitar a contaminação por urina e fezes, e armazenados em o auxílio de tubos de falcon. A qualidade do sêmen de cada peixe foi analisada ao microscópio logo após sua retirada para verificação se apresentava condições mínimas recomendadas para os testes (VIVEIROS et al., 2009).

As três soluções diluidoras elaboradas para o congelamento do sêmen de *S. scriptum* foram preparadas em três diferentes concentrações sêmen: solução diluidora, cujas composições e proporções de crioprotetores podem ser observadas na tabela 4. Foram congeladas seis amostras de sêmen para cada concentração testada, de cada uma das três soluções diluidoras, totalizando 54 amostras por peixe.

Tabela 4. Composição das soluções diluidoras e proporções sêmen: diluidor utilizadas para congelamento das amostras no experimento 2.

Diluidor	Crioprotetor Interno	Crioprotetor Externo	Volumes de crioprotetores e água utilizada nas soluções diluidoras	Proporção Sêmen: Diluidor
A	DMA	Gema de ovo + Glicose	15 ml DMA, 7,5g glicose, 135 ml de água destilada	1:2
				1:4
				1:6
B	DMSO	Gema de ovo+Glicose	15 ml DMSO, 1gema, 7,5g glicose, 135 ml de água destilada	1:2
				1:4
				1:6
C	METANOL	Leite em pó+Glicose	10 ml metanol, 5g leite em pó, 10g glicose, 100 ml de água destilada	1:2
				1:4
				1:6

Fonte: Soluções diluidoras modificadas de Carolsfeld et al. (2003).

O sêmen fresco foi misturado às soluções diluidoras, nas proporções correspondentes e envasado em palhetas de 0,25 ml, identificadas individualmente. O armazenamento do sêmen foi novamente feito de forma que não fosse ativado, evitando o contato com a água ou possíveis contaminações, as amostras foram colocadas em vapor de nitrogênio (dry-shippers), para que os espermatozoides fossem submetidos ao congelamento gradual, durante 30 minutos, e na sequência acondicionadas em botijão de nitrogênio líquido (TAYLOR-Warton, modelo CP300) a -196°C . O descongelamento foi feito pela imersão das palhetas em água à 25°C por 0,27 minutos, $\text{VB} = 828,7$ ($^{\circ}\text{C}/\text{min.}$), utilizando a taxa de descongelação que apresentou melhores resultados no Experimento 1.

A motilidade e as velocidades de deslocamento das amostras foram estimadas por análise computadorizada, feita com auxílio do sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) (SANCHES et al., 2010). Foi gravado um vídeo para cada amostra, através do software AMCap, com duração de 60s, utilizando um microscópio óptico (aumento 10x), iniciando a captura das imagens 120s após o descongelamento da mesma. Foram feitos corte de 15s (135-150s) em cada vídeo (1000 frames), para ativação das amostras descongeladas foi utilizada solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3 1%), com a proporção de 1:50 (amostras crioconservada:solução ativadora). As concentrações (sêmen: solução ativadora) foram utilizadas nas proporções 1:2, 1:4 1:6. Foi elaborado um delineamento experimental com arranjo fatorial, com três fatores: peixe ($n=5$), solução diluidora ($n=3$) e proporção

sêmen:solução (n=3). Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (KW) ($\alpha=0,05$) com a utilização do software Statistica, visto que as variâncias não eram homogêneas. Os peixes foram manipulados de acordo com o protocolo código PP00788 aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina.

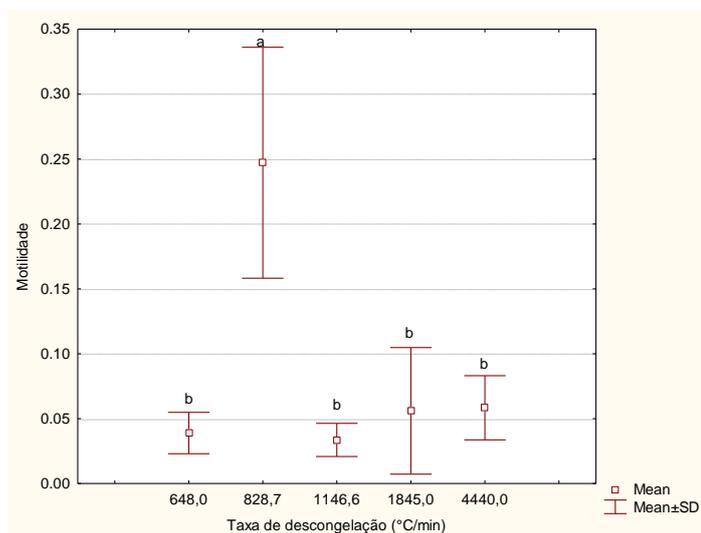
3. RESULTADOS

Para estabelecer um protocolo de crioconservação adequado para o suruvi foi testado e adaptado o protocolo descrito por Carolsfeld et al., (2003) para o surubim pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Em testes preliminares realizados no LAPAD foi observada a influência das soluções diluidoras nas velocidades de deslocamento dos espermatozoides, porém o foco da primeira parte do estudo foram as velocidades de descongelamento, visto que há poucos estudos enfatizando a influência de diferentes crioprotetores em sêmen crioconservado do gênero *Steindachneridion*.

3.1 Experimento 1

Os valores médios da motilidade (MOT) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre as taxas de descongelação. O sêmen descongelado a uma velocidade de 828,7 °C/min. apresentou o maior valor médio de MOT $24,7 \pm 8,9\%$, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2: Valores médios de MOT do sêmen de suruvi após submetido a diferentes taxas de descongelação.



As soluções diluidoras afetaram os parâmetros espermáticos ($p < 0,05$) de VMD (Velocidade Média de Deslocamento) e VLR (Velocidade em Linha Reta) com maiores valores para a solução com metanol. Os valores médios para VMD de $33,88 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ utilizando DMSO e $45,02 \pm 1,94 \mu\text{m/s}$ utilizando metanol, enquanto para VLR as médias foram de $31,51 \pm 0,81$

$\mu\text{m/s}$ utilizando DMSO e $42,56 \pm 1,95 \mu\text{m/s}$ utilizando metanol (figuras 3 e 4). A VCL (Velocidade Curvilnear) foi semelhante entre as soluções diluidoras testadas.

Figura 3: Valores médios de VMD ($\mu\text{m/s}$) do sêmen de suruvi pós-descongelamento para as diferentes soluções diluidoras utilizadas.

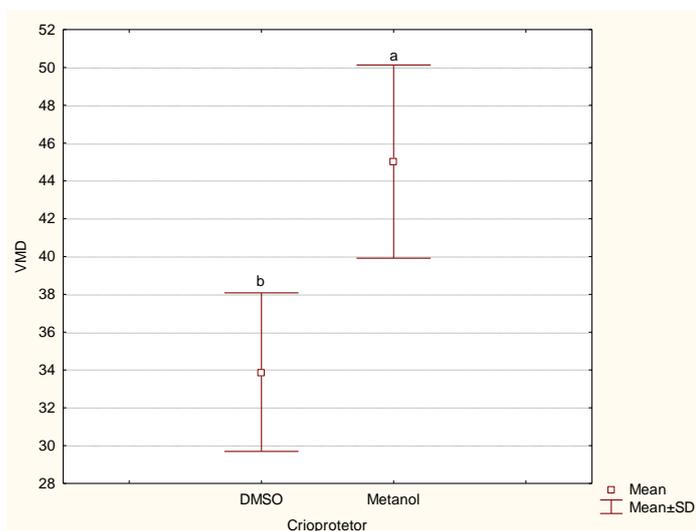
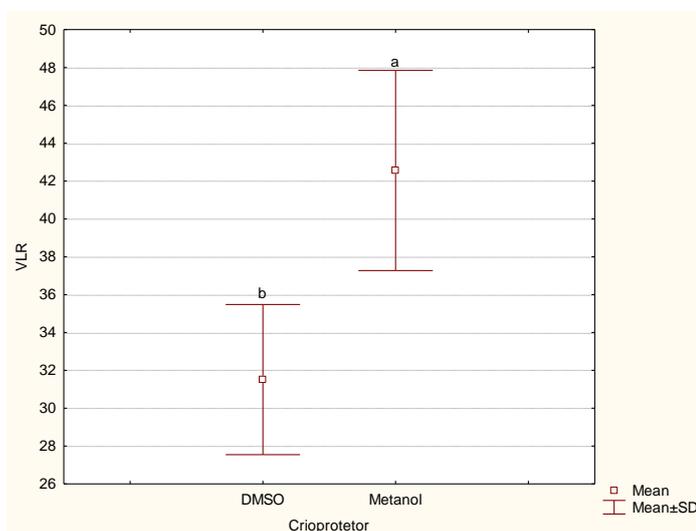


Figura 4: Valores médios de VLR ($\mu\text{m/s}$) do sêmen de suruvi pós-descongelamento para as diferentes soluções diluidoras utilizadas.



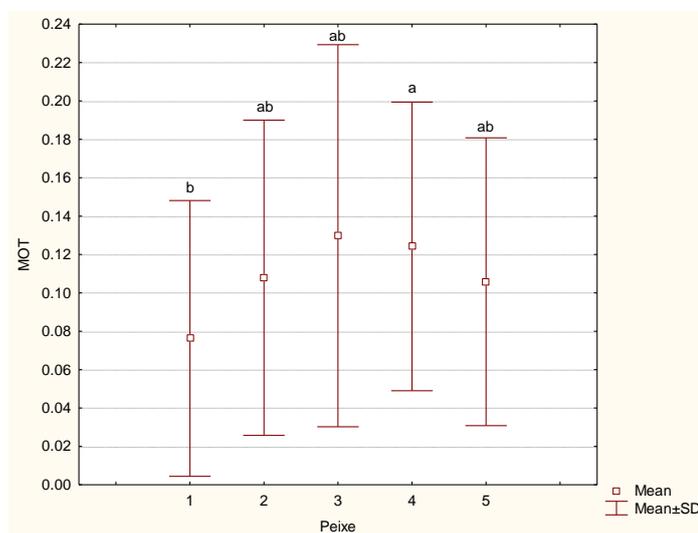
A interação entre as soluções diluidoras e taxas de descongelamento não foi significativa para nenhum dos parâmetros espermáticos. No presente estudo, os resultados dos parâmetros espermáticos demonstraram que o metanol apresenta melhores resultados do que o DMSO como solução crioprotetora para o sêmen de suruvi.

3.2 Experimento 2

Os valores médios obtidos pela análise das amostras estão descritos na Figura 5, onde é possível comparar para as diferentes soluções crioprotetoras utilizadas em distintas diluições (parâmetros analisados pelo CASA).

O parâmetro motilidade (MOT) apresentou ampla variação e foi diferente ($p < 0,05$) entre os peixes 1 e 4, com valores médios de $7,62 \pm 7,18\%$ e $12,42 \pm 7,52\%$ respectivamente.

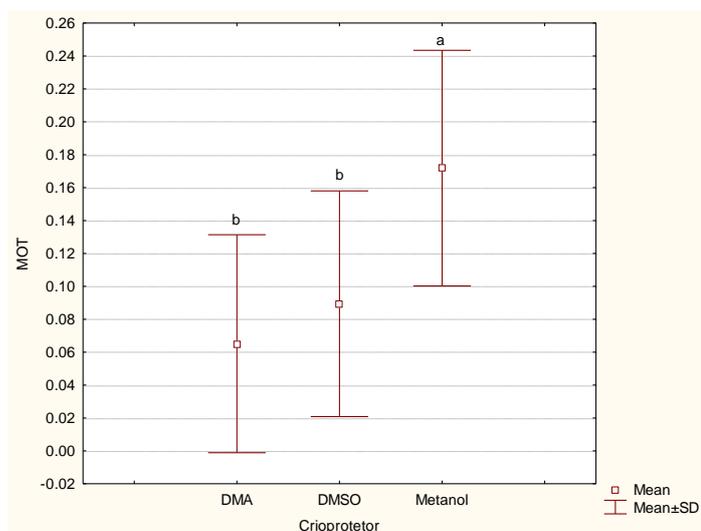
Figura 5: Valores de motilidade (Média \pm desvio padrão) do sêmen de cada exemplar de suruvi testado.



Os valores médios para VCL, VMD e VLR obtidos nas análises foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os peixes testados.

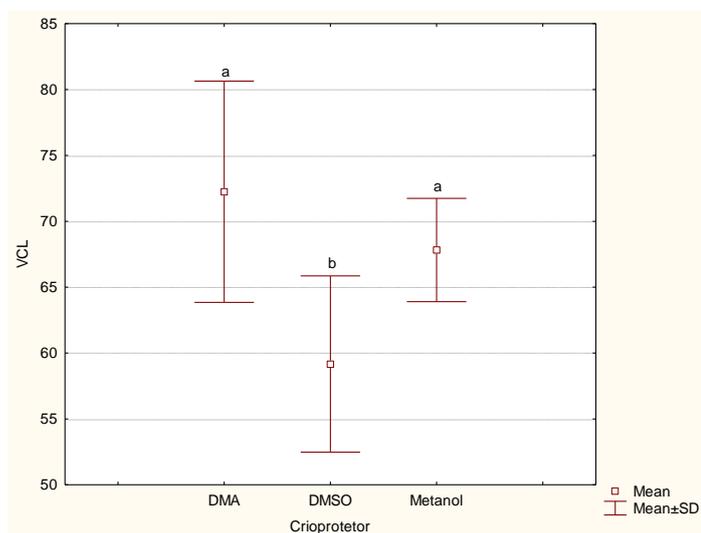
Considerando as soluções diluidoras testadas, a MOT apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o metanol (média $17,18 \pm 1,92\%$) e os demais crioprotetores. O metanol respondeu de forma diferente em relação ao DMA, que apresentou média de $6,51 \pm 1,13\%$ e o DMSO, com média $8,94 \pm 2,94\%$ (Figura 6).

Figura 6: Valores médios de MOT do sêmen de suruvi com as soluções diluidoras testadas.



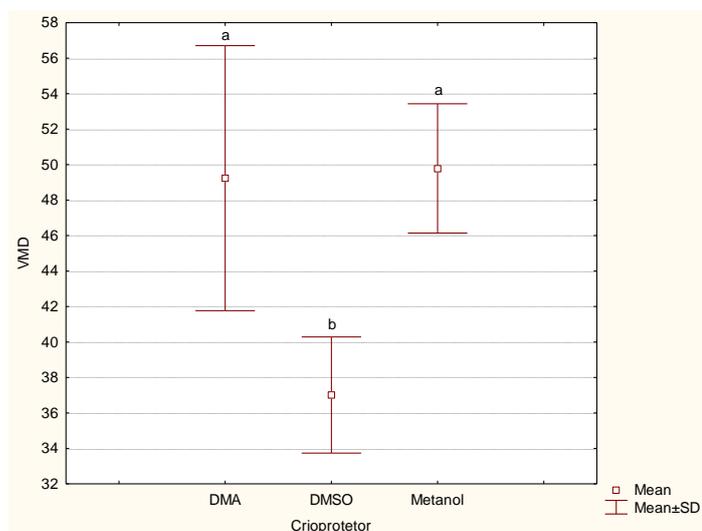
As soluções diluidoras testadas também afetaram de modo distinto ($p < 0,05$) o parâmetro VCL, com o pior resultado para a solução contendo DMSO, que apresentou média de $59,17 \pm 6,68 \mu\text{m/s}$, enquanto que aqueles a base de metanol ($67,82 \pm 3,92 \mu\text{m/s}$) e DMA ($72,24 \pm 8,39 \mu\text{m/s}$) foram semelhantes entre si (Figura 7).

Figura 7: Valores médios de VCL ($\mu\text{m/s}$) para cada solução diluidora testada.



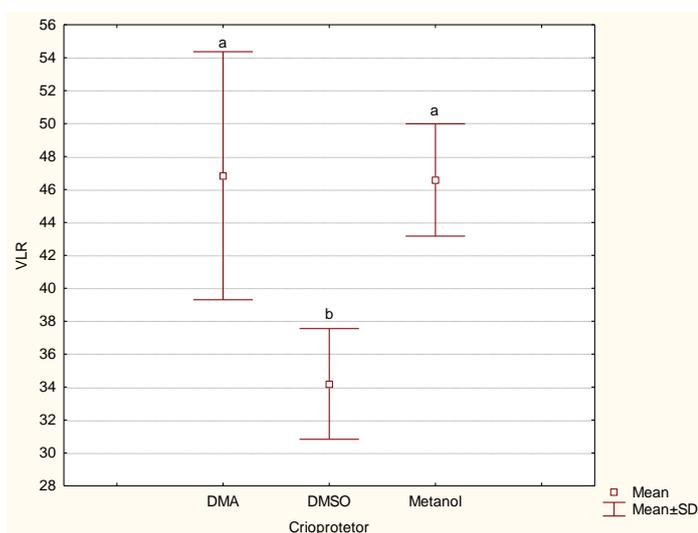
O efeito das soluções crioprotetoras sobre a VMD foi semelhante aos da VCL, com a solução diluidora composta por DMSO apresentou os menores valores (média $37,01 \pm 3,27 \mu\text{m/s}$) em comparação a solução contendo DMA ($49,23 \pm 7,47 \mu\text{m/s}$) e metanol ($49,79 \pm 3,64 \mu\text{m/s}$) (Figura 8).

Figura 8: Valores médios de VMD ($\mu\text{m/s}$) para cada solução diluidora testada.



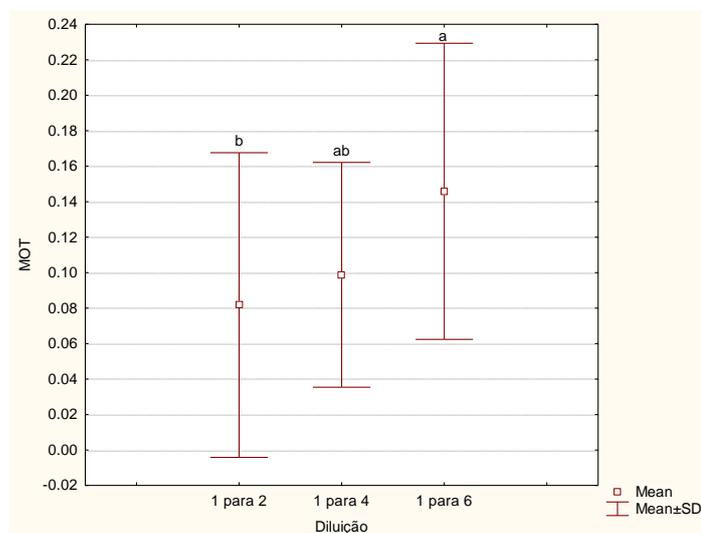
O parâmetro VLR apresentou o mesmo padrão de resposta das velocidades anteriores com a variação da solução crioprotetora, onde as soluções a base de DMA e metanol foram semelhantes entre si ($46,83 \pm 7,53 \mu\text{m/s}$ e $46,58 \pm 3,41 \mu\text{m/s}$), enquanto que a solução a base de DMSO apresentou os menores valores, $34,19 \pm 3,36 \mu\text{m/s}$ (Figura 9).

Figura 9: Valores médios de VLR ($\mu\text{m/s}$) para cada solução diluidora testada.



Entre as diluições analisadas os parâmetros VCL, VMD e VLR foram semelhantes ($p > 0,05$). Apenas a MOT foi influenciada pela diluição ($p < 0,05$). Na figura 10 é possível observar que as proporções 1:2 e 1:6 são diferentes entre si, com melhor valor de MOT para a maior diluição do sêmen. As médias obtidas, para MOT foram de $8,17 \pm 8,59\%$ (diluição 1:2), $9,87 \pm 6,34\%$ (diluição 1:4) e $14,58 \pm 8,22\%$ (diluição 1:6).

Figura 10: Resultados para MOT (%), testadas entre as três diferentes diluições pós-descongelamento.



4. DISCUSSÃO

Inicialmente este estudo buscou contribuir de forma ativa na elaboração de um protocolo de crioconservação para a espécie, frente à diminuição constante da ocorrência da espécie em seu habitat natural. Através da revisão da literatura para desenvolver o estudo foi notável a carência de informações para espécie em questão, os estudos existentes para o sêmen fresco foram utilizados como base, partindo do princípio de que o sêmen *in natura* apresenta o melhor desempenho.

Existe uma grande variabilidade quanto à crioresistência das células espermáticas, não somente entre as espécies de peixes, como entre indivíduos da mesma espécie (VIVEIROS; GODINHO, 2009), o que vem de encontro aos resultados produzidos para MOT no experimento 2, onde não houve um padrão uniforme de resposta para todos os peixes. No experimento 2 a solução a base de metanol produziu melhor resultado de motilidade do que as soluções a base de DMA e DMSO.

Era esperado que as diluições feitas com proporções mais altas de crioprotetor interno causariam maior dano, pois segundo Peñaranda et al. (2009) maiores diluições deteriorariam mais rapidamente as estruturas morfológicas das células espermáticas. O metanol é a substância que mais facilmente permeia a membrana celular, porém não há estudos relatando que os compostos envolvidos nas soluções diluidoras necessitam permear as células para

serem eficazes (VIVEIROS, 2011). O DMSO, que é amplamente utilizado por apresentar resultados satisfatórios em diversas espécies de Characiformes (GODINHO e VIVEIROS, 2011), não apresentou os melhores desempenhos neste estudo.

Segundo Stoss (1983) baixas velocidades de descongelamento causam injúrias mecânicas nos espermatozoides devido à recristalização do gelo intracelular. Por outro lado as grandes velocidades de descongelamento não permitem a reabsorção da água perdida pela célula durante o congelamento (LEUNG, 1991). A toxicidade dos crioprotetores também é um fator que influencia a viabilidade dos espermatozoides, o DMSO-gema de ovo e o metanol-leite em pó foram testados como soluções diluidoras para o sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (CAROLSFELD et al. 2003) e a solução baseada no metanol foi mais eficiente pós o descongelamento. As velocidades de deslocamento não apresentaram diferença significativa em função da diluição, mas apresentaram diferença significativa com as distintas soluções diluidoras testadas. Segundo Peñaranda (2009), as interações DMA+glicose, metanol+glicose e DMSO+glicose não atuaram da mesma forma nas estruturas celulares do espermatozoide da enguia europeia. A interação entre a glicose e os crioprotetores internos, que pode ter influenciado nos resultados com a enguia europeia, também foi observada por Viveiros et al. (2009), quando usou menores proporções sêmen:solução diluidora e obteve uma proteção as células espermáticas mais eficaz em characiformes.

Com relação às proporções utilizadas, as médias obtidas pela análise das amostras descongeladas mostraram melhores resultados para proporções mais altas, 1:4 e 1:6, mas deve-se considerar que na primeira parte do experimento não foi testado o DMA como crioprotetor interno, dessa forma não é possível afirmar que ele responderá da mesma forma que o DMSO e o metanol para a taxa de descongelação utilizada. O que comprova que diferentes espécies apresentam diversos graus de sensibilidade a diferentes crioprotetores (PEÑARANDA et al., 2009). As velocidades de deslocamento apresentaram as melhores médias para as amostras contendo DMA, enquanto as diferentes taxas de diluição não influenciaram significativamente para estes parâmetros.

Os resultados obtidos deixam claro que indivíduos de uma espécie respondem de forma diferente a um mesmo protocolo, como já relatado na literatura. Há estudos atualmente em desenvolvimento para outra espécie do gênero *Steindachneridion* mostrando que a presença de lactose e a concentração da glicose utilizadas na solução diluidora podem interferir na qualidade das células espermáticas, o que indica que outros fatores também

podem interferir diretamente nos resultados da qualidade do sêmen criopreservado. Com o desenvolvimento do experimento muitas hipóteses e dúvidas surgiram, dentre elas uma levou a incluir o DMA como crioprotetor interno, utilizado apenas no experimento 2.

Os parâmetros avaliados podem ainda ter sofrido influência de diversos fatores como: idade e peso do animal, temperatura de aclimação, estresse do manejo, estado nutricional, indução hormonal, além de falhas durante a coleta e manipulação do sêmen (SOLIS-MURGAS et al., 2011). É notável que o processo de crioconservação afeta o desempenho dos espermatozoides, porém o processo de fertilização é considerado um estudo complementar a este, que irá permitir conclusões mais específicas no que diz respeito aos danos causados na estrutura celular das organelas envolvidas.

5. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos com o presente trabalho é possível observar que as soluções diluidoras a base de metanol apresentam os melhores valores de motilidade (MOT) do sêmen de suruvi, enquanto que as velocidades de deslocamento que apresentaram maiores valores foram nas amostras que utilizaram o DMA como crioprotetor interno. Porém fica evidenciada a necessidade de estudos complementares para avaliar danos à estrutura morfológica das células espermáticas, bem como testar a taxa de descongelamento que produzam melhores resultados quando o DMA é utilizado como crioprotetor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ARAÚJO, R.V. Subjective and computer assisted motility of sperm criopreserved in DMSO-based media of the endangered fish species surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriforme). Tese (Doutorado), v.1, p. 36-64. UFLA, 2011.

ARAÚJO, R.V. Fertility, velocities and motility of surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriforme) sperm cryopreserved in lactose and lactose-free media. Tese (Doutorado), v.1, p.65-91. UFLA, 2011.

BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L.C. (Orgs), Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil, 2ª edição, p. 363-382. Editora UFSM, Santa Maria, 2010.

BELLE, S.M.; NASH, C.E. 2009. Better Management Practices for Net-Pen Aquaculture. In: Tucker, C.S. and Hargreaves, J.A. (eds). Environmental Best Management Practices for Aquaculture Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

BERT T. 2007. Ecological and genetic implications of aquaculture activities. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 555 p.

BEUX, L.F.; ZANIBONI-FILHO, E. 2008. Produção pesqueira do reservatório de Itá, alto rio Uruguai. In: ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. (Eds.). Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna. Florianópolis: Ed. da UFSC, p. 87-108.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. Cell Tissue Research, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, June, 1983.

BLAXTER, J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature, London, v. 172, p. 1189-1190, Oct. 1953.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI-FILHO, E. e HARVEY, B.J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation, Journal of Fish Biology, 63(2): 472-489.

CHAMMAS, M. A. 2008. Reflexões sobre as bases técnicas e conceituais para o desenvolvimento da Aquicultura. In: OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J.R.; SOTO, D. (Eds.) Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília, Cap. 9, p. 229-246.

Energia. 128p.

COSSON, M.P. et al., Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. Aquaculture, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 71-75. Jan, 1985.

GREER, D.; HARVEY, B. 2004. Blue Genes: Sharing and Conserving the World's Aquatic Biodiversity. London: Earthscan, Print. 238p.

HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P. M. (Ed.) Cryopreservation in aquatic species. Amsterdam: World Aquaculture Society, 2000, p. 332-337.

KAVAMOTO, E.T. et al. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v.16, n. 1, p. 29-36, 1989.

LEUNG, L.K.P.; JAMIESON, B.G.M. (Ed.). Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa, Cambridge, Cambridge University, 1991, p. 245-295.

LEUNG, L. K. 1991. Principles of biological cryopreservation. Pp. 231-244. In Jamieson B. G. M. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

MMA, 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. (A.B.M. Machado, G.M. Drummond & A.P.Paglia, Eds). Ministério do Meio Ambiente, Brasília; Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, V. 2, p. 1420. Biodiversidade, 19.

MPA. 2010. Casos de sucesso na Aquicultura no Brasil. FAO, Brasília, 96 p.

PEÑARANDA, D. S., PÉREZ, L., GALLEGO, V., JOVER, M., ASTURIANO, J. F. Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. Cryobiology, v. 59, p 119-126, 2009.

RAVINDER, K. et al. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology*, London, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, June 1997.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (eds). 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre. 729 p.

SANCHES, E. A., R. M. MARCOS, R. Y. OKAWARA, D. CANEPPELE, R.A. BOMBARDELLI, AND E. ROMAGOSA, 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology*, 29: 1114-1122.

SILVEIRA, W.F. da; KAVAMOTO, E.T.; NAHARA, M.V. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre *Rhamdia lillarii* (Valenciennes, 1840). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v.12, n. 2, p. 7-11, 1985.

SOLIS-MURGAS, L. D., FELIZARDO, V. O., FERREIRA, M. R., ANDRADE, E. S., VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Revista Bras. Reprod. Animal*, v. 35, p. 186-191, 2011.

STOSS, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. Pp. 305-350. In W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (eds.), *Fish Physiology*. Academic Press.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Phys. Bioch.*, v.35, p.137-150, 2009.

VIVEIROS et al., Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prologus lineatus*) sperm cryopreserved in powered coconut water. *Theriogenology*, Stoneham, v.74, n. 4, p. 551-556, Aug 2010.

WEINGARTNER, M.; REYNALTE-TATAJE, D.; MEURER, S. ZANIBONI-FILHO, E. 2003. Preliminary results of induced reproduction of the suruvi, *Steindachneridion scriptum*

(Siluriformes Pimeloidae). In: world Aquaculture 2003, Salvador. Book Abstracts World Aquaculture 2003, Vol. Único.

WILSON-LEEDY, J.G., INGERMANN, R.L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebra fish sperm motility parameters. Theriogenology, Stoneham, v. 67, n. 3, p 661-672, Feb. 2007.

ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S.; SHIBATTA, O.A.; NUÑER, A.P.O. 2004 Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai. Florianópolis, EDUFSC/Tractebel.