



**ISADORA DE LIMA ASSIS**

**EFEITO DA MELATONINA NO SÊMEN  
CRIOPRESERVADO DE CURIMBA (*Prochilodus  
lineatus*)**

**LAVRAS - MG  
2017**

**ISADORA DE LIMA ASSIS**

**EFEITO DA MELATONINA NO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE  
CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Coorientadora:  
Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula

**LAVRAS – MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Assis, Isadora de Lima.

Efeito da melatonina no sêmen criopreservado de curimba  
(*Prochilodus lineatus*) / Isadora de Lima Assis. - 2017.

71 p. : il.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Daniella Aparecida de Jesus Paula.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Congelamento. 2. Qualidade Seminal. 3. Antioxidante. I.  
Murgas, Luis David Solis. II. Paula, Daniella Aparecida de Jesus.  
III. Título.

**ISADORA DE LIMA ASSIS**

**EFEITO DA MELATONINA NO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE  
CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)  
EFFECT OF MELATONIN ON CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)  
CRYOPRESERVED SPERM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de abril de 2017.

Dr. Luis David Solis Murgas

Dra. Aline Ferreira Souza de Carvalho

Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula

Dra. Mariana Martins Drumond

UFLA

UninCor

IF Sudeste MG

CEFET - MG

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

**LAVRAS – MG  
2017**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que me dá forças para seguir em frente e permite que todos os meus sonhos se realizem;

Aos meus pais, Sebastião e Luiza, razões do meu viver, que me apoiam em todas as decisões tomadas;

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de aprendizado;

À FAPEMIG, pelo suporte financeiro concedido durante o Mestrado;

Ao Professor e orientador Luis David Solis Murgas, que desde o início acreditou no meu potencial. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, carinho e confiança durante esses anos;

À Aline, Isadora, Gilmara e Daniella, pela amizade, auxílio nos experimentos, desabafos, risos e toda diversão que proporcionam;

À Mari, que aceitou de bom grado se deslocar até Lavras para participar da banca de defesa e contribuir com o trabalho;

A todos os amigos do Biotério, em especial Viviane, Naiara, Victor, Priscila, Laís e Gilmar, que fazem dos meus dias mais felizes no laboratório e que estão sempre prontos para ajudar;

Às amigas de longa data: Ana Beatriz, Andressa e Bárbara; e às amigas: Larissa, Natália, Thaisa, Lorena, Patrícia, Raphaela e Lívia, que foram um dos maiores presentes que a UFLA me deu, por todo o companheirismo, incentivo e paciência;

**A todos o meu MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Considerando que os danos oxidativos verificados durante o processo de congelamento do sêmen sejam uma das principais causas da diminuição de sua viabilidade e que a suplementação de melatonina seja capaz de aumentar a tolerância espermática pós-descongelamento, objetivou-se, com este trabalho, avaliar os efeitos da adição de diferentes doses de melatonina nos parâmetros de motilidade, morfologia e capacidade de fertilização do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. Para isso, após o tratamento hormonal dos machos com extrato de hipófise de carpa e coleta seminal, foram realizados quatro pools de sêmen, homogêneos a cada dois animais e diluído em soluções contendo: Controle Positivo (C+): BTS (5%) + DMSO (8%), e os tratamentos T1, T2 e T3: BTS (5%) + DMSO (8%) acrescidos de concentrações de 1, 2 e 3mM de melatonina, respectivamente. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml, congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (*dry shipper*), onde ocorre decréscimo de 35,6 graus por minuto até a temperatura de -170°C e posteriormente transferidas para botijão de nitrogênio líquido a -196°C até o dia do descongelamento. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 12 segundos cinco meses após o congelamento para análises de motilidade e morfologia espermáticas, e um ano após o congelamento para avaliação da taxa fertilização. Os parâmetros de taxa de motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média de percurso (VAP) do sêmen após o descongelamento foram determinados utilizando o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre as taxa de motilidade progressiva e as velocidades (VCL, VSL e VAP) do sêmen criopreservado nos diferentes tratamentos. A taxa de motilidade total apresentou-se maior ( $P < 0,05$ ) nos grupos contendo 1 e 2mM de melatonina quando comparados ao T3, porém não diferiram-se do C+. No que diz respeito à morfologia, a porcentagem de anomalias espermáticas aumentou com o processo de criopreservação ( $P < 0,05$ ). Entretanto, todos os tratamentos apresentaram valores similares de anomalias totais pós-descongelamento e não diferiram entre si quanto à capacidade de fertilização ( $P > 0,05$ ). Conclui-se, portanto, que a adição de melatonina à solução crioprotetora de sêmen de curimba não foi capaz de promover maior viabilidade ao sêmen criopreservado.

**Palavras-chave:** Congelamento. Qualidade Seminal. Antioxidante. CASA.

## GENERAL ABSTRACT

Considering that oxidative damages observed during the semen freezing process are one of the main causes of the decrease of its viability, and that the melatonin supplementation is capable of increasing the sperm tolerance after thawing, the objective of this work was to evaluate the effects of the addition of different doses of melatonin on the parameters like motility, morphology and fertilization capacity of the cryopreserved semen of *Prochilodus lineatus*. After males' hormonal treatment with carp pituitary extract and seminal collection, four groups were set with the homogenized semen of two animals and diluted in solutions containing: Positive Control (C+): BTS (5%) + DMSO (8%), and the treatments T1, T2 and T3: BTS (5%) + DMSO (8%) plus concentrations of 1, 2 and 3mM of melatonin, respectively. The diluted semen was placed in straws of 0.5 ml and frozen in a cylinder of vapor nitrogen (dry shipper), where the temperature decrease occurred from 35.6 degrees per minute until the temperature of -170°C. After the frozen process, the straws were stored in a nitrogen cylinder at -196°C until thawing. Five months after freezing, the straws were thawed in a water bath at 40°C for 12 seconds in order to conduct the analysis of sperm motility and morphology. One year after freezing the fertilization rate evaluation was made. The parameters of total and progressive motility rate, curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL) and mean velocity (VAP) of the semen after thawing were determined using the computerized semen analysis system (SCA). The data were submitted to analysis of variance, and the means were compared by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). There were no differences ( $P > 0.05$ ) between the progressive motility rates and the velocities (VCL, VSL and VAP) of the cryopreserved semen in the different treatments. The total motility rate was higher ( $P < 0.05$ ) in the groups containing 1 and 2mM of melatonin when compared to T3, but they did not differ from C+. For morphology analysis, the percentage of sperm abnormalities increased with the cryopreservation process ( $P < 0.05$ ). However, all treatments had similar values after thawing of total anomalies and did not differ in fertilization capacity ( $P > 0.05$ ). In conclusion, with these results it is possible to infer that the addition of melatonin to the cryoprotectant solution of curimba semen was not able to promote greater viability to the cryopreserved semen.

**Keywords:** Freezing. Seminal quality. Antioxidant. SCA.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Introdução Geral.....</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Características seminais de peixes.....</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Motilidade espermática .....</b>	<b>13</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1.1</b>	<b>Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen – CASA .....</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Anomalias espermáticas .....</b>	<b>19</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Concentração espermática .....</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Criopreservação do sêmen .....</b>	<b>21</b>	<b>21</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Danos causados ao espermatozoide pela criopreservação.....</b>	<b>23</b>	<b>23</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Soluções diluidoras e crioprotetoras do sêmen de peixes .....</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Atividade antioxidante no plasma seminal .....</b>	<b>27</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1.1</b>	<b>Melatonina.....</b>	<b>29</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Descongelamento do sêmen de peixes .....</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Capacidade de fertilização do sêmen de peixes .....</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>35</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>	<b>36</b>
	<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Efeito da melatonina no sêmen criopreservado de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....</b>	<b>49</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>	<b>51</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>	<b>67</b>



## **CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

### **1 INTRODUÇÃO**

O estabelecimento de protocolos eficientes para conservação de sêmen de peixes permite solucionar problemas referentes a questões econômicas e ecológicas. Com o aumento da população, da demanda por alimentos de qualidade e da necessidade de minimizar os impactos gerados pela atividade antrópica como pesca predatória, sobrepesca, poluição e construção de barragens hidrelétricas, o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial se fazem necessárias.

A criopreservação envolve procedimentos que permitem o armazenamento dos espermatozoides viáveis, em nitrogênio líquido, por tempo indeterminado. Dessa maneira, ela se torna importante na rotina de reprodução induzida e na melhoria genética das espécies de peixes, facilitando o desenvolvimento de pesquisas, transporte e minimizando a assincronia na maturação dos gametas. Entretanto, variações na composição seminal das espécies dificultam a padronização da solução crioprotetora a ser acrescida antes do congelamento que, quando incorreta, torna os espermatozoides vulneráveis à mudança da osmolaridade do meio e ao choque frio, acarretando alterações morfológicas, queda de motilidade e, conseqüentemente, diminuição da capacidade de fertilizar o ovócito.

Os danos celulares gerados ao espermatozoide pela criopreservação também podem ser oriundos do excesso da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que, em grandes concentrações, são altamente tóxicos. Faz-se, então, importante encontrar meios de minimizar os efeitos deletérios do processo através da adição de um antioxidante às soluções crioprotetoras. Estudos têm demonstrado que a melatonina, hormônio produzido principalmente

pela glândula pineal, é capaz de reduzir o estresse oxidativo através da eliminação direta de radicais livres ou estimulando a atividade de enzimas antioxidantes (REITER et al., 2009). Pesquisadores que a utilizaram como aditivo ao meio crioprotetor obtiveram resultados satisfatórios na manutenção da qualidade do sêmen de mamíferos (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; GHAZALEH et al., 2015), tornando-a promissora como antioxidante, também, para sêmen de peixes.

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie nativa da bacia do Rio Grande que apresenta considerável valor econômico devido à facilidade de cultivo, alta produtividade em cativeiro, apresentar larvas que servem de forrageiras para espécies carnívoras de grande valor comercial, e principalmente, por ter a carne saborosa e aceita pelo mercado consumidor, especialmente na região nordeste do Brasil. Entretanto, por sofrer interferência de ações antrópicas anteriormente citadas, o estoque de suas populações selvagens tem diminuído, tornando-se imprescindíveis as definições de protocolos eficientes na manutenção da viabilidade de seus espermatozoides após o processo de criopreservação.

Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de melatonina ao meio crioprotetor de sêmen de curimba sobre os parâmetros de motilidade, morfologia e capacidade fertilizante dos espermatozoides.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Curimba (*Prochilodus lineatus*)

*Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecida popularmente no Brasil como curimba, corimbatá, papa-terra ou grumatã e em outros países da América do Sul como sábalo, é uma espécie de peixe da Classe Actinopterygii, Ordem Characiforme e família Prochilodontidae. Seu gênero *Prochilodus* apresenta 13 espécies descritas e elevada distribuição pela região Neotropical, sendo que no Brasil está presente em todas as principais bacias hidrográficas (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003).

A curimba é uma espécie de médio porte que apresenta cabeça larga, corpo alongado podendo atingir até 74cm de comprimento (SVERLIJ; ROS; ORTI, 1993) e peso corporal superior a 6kg (CRUZ, 2001). Possui boca circular, lábios grossos, móveis e com denticulos diminutos em duas séries. Machos e fêmeas apresentam uma cor cinza esverdeada e características externas quase idênticas, entretanto, os machos atingem a fase reprodutiva, em média, aos dois anos de idade, quando com comprimento corporal aproximado de 24cm, ao passo que as fêmeas a atingem somente aos três anos de idade e 31cm (COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS - CEMIG/FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 2000).

A espécie apresenta hábito alimentar iliófago nas fases juvenis e adulta. Alimenta-se de substrato formado de lodo, areia, organismos bentônicos e microrganismos em decomposição e, em decorrência desse hábito, exerce importante função no fluxo de energia do ambiente aquático em que vive, via processamento de sedimentos (JEPSEN; WINEMILLER; TAPHORN, 1997; LOGATO, 2000). Em épocas mais secas, a curimba habita preferencialmente regiões tranquilas e quentes, no leito dos rios, mas pode ser encontrada em

cursos naturais onde a turbidez da água apresenta-se mais elevada (SVERLIJ; ROS; ORTI, 1993). Quando em época de reprodução é altamente dependente de estímulos ambientais como profundidade e corredeiras (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010), realizando migração em massa por várias centenas de quilômetros até a área de desova, no período que se estende de novembro a janeiro (CEMIG/CETEC, 2000) (FIGURA 1).

**Figura 1** - Exemplar de curimba.



Fonte: Do autor (2017)

A curimba é considerada um dos peixes de maior importância para a piscicultura comercial. Pode ser utilizada para obtenção de materiais como farinha de peixe, azeite e cosméticos, e sua carne é bastante apreciada no Brasil, sobretudo na região nordeste do país. Apresenta alta rusticidade, facilidade de manejo, prolificidade e suas larvas são utilizadas como forrageiras para espécies de peixes carnívoras de grande valor econômico ou ameaçadas de extinção, como o jaú (*Zungaro jahu*), a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (VIVEIROS et al., 2009) e dourado (*Salminus brasiliensis*) (MURGAS et al., 2003). Estudos demonstraram que as larvas de curimba apresentam tamanho ideal para alimentação das larvas de dourado após a eclosão, quando iniciam a alimentação exógena (SCHÜLTZ, 2003; VEGA-ÓRELLANA; FRACALOSSO; SUGAI, 2006).

Alguns autores têm sugerido que em decorrência de seu hábito alimentar e por apresentar alta sensibilidade a variações da qualidade de água, como

alterações de pH, a presença de xenobióticos e diversos outros tipos de poluentes, sua sobrevivência pode ser comprometida pela atividade agrícola inapropriada, introdução de espécies exóticas, urbanização e sobrepesca (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007; BARLETTA et al., 2010), tornando-se imprescindíveis estudos que contribuam para uma maior produtividade e conservação da biodiversidade de curimba.

## **2.2 Características seminais de peixes**

Estudos envolvendo a biologia seminal dos peixes têm demonstrado uma grande variabilidade intra e interespecífica, principalmente no que diz respeito à concentração, volume e composição do sêmen. Essas variações são atribuídas a interações complexas de fatores como diversidade genética, envelhecimento dos espermatozoides no testículo, sazonalidade e estratégias reprodutivas associadas às adaptações necessárias para cada espécie (BILLARD, 1986; RURANGWA et al., 2004).

Em geral, o sêmen é composto de um líquido ou suspensão celular semi-gelatinosa (plasma seminal) e pelos espermatozoides (RURANGWA et al., 2004). O plasma seminal é um fluido produzido pelos testículos e ducto espermático. Este fluido apresenta diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídeos, açúcares e ácidos responsáveis por fornecer proteção e viabilidade à célula espermática, através da regulação da osmolaridade, manutenção da imobilidade dos espermatozoides no trato genital e, principalmente, proteção destes espermatozoides contra danos oxidativos e proteolíticos (CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2000; GARNER; HAFEZ, 2004; HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004).

O espermatozoide de peixes teleósteos divide-se em cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça contém o núcleo com o DNA paterno e é

destituída de acrossoma. A ausência de acrossoma difere os peixes de vertebrados superiores, mas compensa-se pela presença da micrópila, um orifício no ovócito das fêmeas que permite a penetração do gameta masculino (COSSON et al., 1999). A peça intermediária é pequena e composta de mitocôndrias, cuja função é gerar energia para o batimento flagelar. A cauda ou flagelo, constituído por dois microtúbulos centrais e nove periféricos, formando o axonema, é responsável pela movimentação do espermatozoide (BORELLA et al., 2014; LAHNSTEINER; PARTZNER, 2008).

### **2.2.1 Motilidade espermática**

A motilidade é o parâmetro mais utilizado para a avaliação da qualidade seminal (COSSON et al., 2008; MURGAS et al., 2011), entretanto não deve ser utilizada como o único indicativo. Avaliações envolvendo taxas de fertilização, concentração e morfologia seminal também se mostram eficientes e aumentam a confiabilidade da caracterização da qualidade espermática.

Os espermatozoides de peixes teleósteos permanecem imóveis nos testículos e trato genital e essa condição resulta da osmolaridade isotônica e composição do plasma seminal. A motilidade espermática é transitória, irreversível e desencadeada após a liberação do espermatozoide (assim como sua dispersão/diluição) em solução aquosa. No geral, em peixes de água doce, a motilidade é induzida por pressão hiposmótica, contrapondo-se às espécies marinhas em que a indução ocorre por pressão hiperosmótica (ALAVI; COSSON, 2006; BILLARD et. al, 1995; TAKAI; MORISAWA, 1995). Algumas espécies anádromas e eurialinas podem ter a motilidade iniciada por diferentes osmolaridades, possivelmente porque os espermatozoides dessas espécies desenvolveram mecanismos que permitem a sua ativação em água

salobra e doce (BALDISSEROTO; GOMEZ, 2005; HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004; YANG; TIERSCH, 2009).

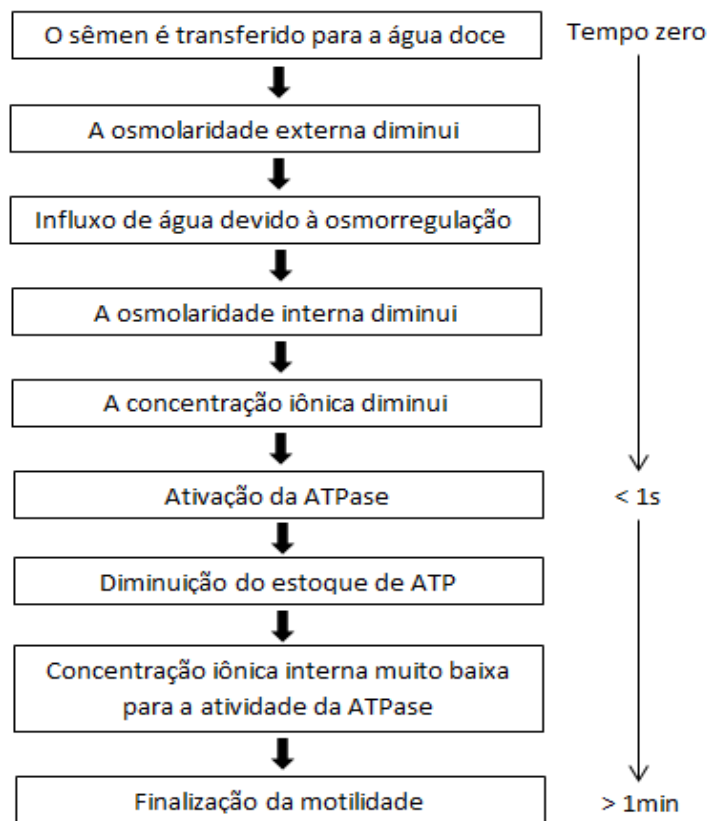
A ativação espermática é iniciada, principalmente, pela alteração do ambiente externo. Em peixes de água doce, como a solução ativadora é hiposmótica, há entrada de água nas células espermáticas, o que desencadeia eventos envolvendo íons  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  e conseqüentemente a liberação de energia pelas mitocôndrias para o batimento flagelar (CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2000; COSSON, 2010; TAKAI; MORISAWA, 1995). Quando os espermatozoides entram em contato com um meio hiposmótico, há uma diminuição na concentração de íons  $K^+$  no plasma seminal, ocorrendo o efluxo desse cátion para o meio extracelular. Este evento estimula a abertura de canais de  $Ca^{2+}$  e seu influxo para o interior da célula espermática, permitindo, assim, o início da motilidade (ALAVI; COSSON, 2006). Além disso, o  $Ca^{2+}$  apresenta importante papel como segundos mensageiros, que são indispensáveis para a transdução do sinal interno (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). Fatores como pH ou a troca de íons realizada entre a solução diluidora e o espermatozoide são capazes de polarizar a membrana celular e, conseqüentemente, estimular a motilidade (MORISAWA et al., 1999).

O trifosfato de adenosina (ATP) é a principal molécula energética e deriva-se da glicólise e respiração mitocondrial, sendo hidrolisado intensamente durante a fase ativa da motilidade. A utilização da energia é muito maior que sua produção, resultando em curta duração da motilidade e sua interrupção total quando 50 a 80% dos ATP's são consumidos (BILLARD et al., 1995; BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005; INGERMANN, 2008). O tempo de movimentação das células espermáticas de peixes de água doce é curto, durando de 1 a 2 minutos, porém extremamente variável entre as espécies (BILLARD et al., 1995; COSSON et al., 1999). Para sêmen *in natura* de

curimba foram observados tempos que variaram de 43 a 612 segundos (CÓSER; GODINHO; RIBEIRO, 1984; FRANCISCATTO et al., 2002).

Na Figura 2 estão relacionados alguns dos eventos possivelmente desencadeados após a exposição espermática ao estresse osmótico, sendo possível verificar que a síntese do ATP relaciona-se com a enzima ATPase, sendo esta última dependente da osmolalidade do meio intracelular.

**Figura 2** - Cascata de eventos desencadeadores da motilidade espermática em peixes de água doce.



Fonte: Adaptado de Miliorini (2006).



Outro evento que ocorre durante o início da motilidade e merece destaque é a alteração do volume celular. Em ambiente hiposmótico ocorre influxo de água e tumefação celular resultante da difusão passiva da água doce, e o volume citoplasmático das células espermáticas pode aumentar até três vezes na tentativa de manter o equilíbrio osmótico entre os meios (HU et al., 2009; PERCHEC-POUPARD et al., 1997).

A simples estimativa das taxas de motilidade do sêmen de peixes nativos vêm sendo realizada por meio da observação da movimentação dos espermatozoides após a diluição deste à solução ativadora, em microscópio óptico, a um aumento de 200 ou 400x (CANEPPELE, 2011; MARIA et al., 2010; MURGAS et al., 2004; SANCHES et al., 2009; WITECK et al., 2011).

Os resultados são expressos em porcentagem de células móveis, em uma escala de 0 a 100%, em relação ao total de células avaliadas. Essas mensurações realizadas levantam questionamentos acerca de sua validação, pois dependem somente da experiência do avaliador, e um estudo demonstrou que há cerca de 30 a 60% de variação nas estimativas realizadas subjetivamente, devido à limitação humana em quantificar diferentes subpopulações na amostra (KOH et al., 2010; MATOS et al., 2008).

A utilização de softwares específicos para análise da motilidade espermática assistida por computador tem se tornado uma importante ferramenta para avaliação da qualidade dos espermatozoides, auxiliando na escolha dos melhores gametas e reprodutores do plantel (RURANGWA et al., 2001; WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007).

#### **2.2.1.1 Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen – CASA**

O CASA, Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (do inglês: *Computer-Assisted Sperm Analyzer*), é o método mais objetivo e abrangente para

quantificação da qualidade seminal disponível na atualidade. Ele fornece informações acuradas, precisas e significativas da movimentação dos espermatozoides, bem como de subpopulações de células espermáticas, através da visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas (AMANN; KATZ, 2004). Entretanto, apesar das inúmeras vantagens na utilização do programa, sua aplicação ainda não é rotineira, visto que o equipamento, composto por um microscópio de contraste de fase acoplado a uma câmera de vidro que reproduz imagens para um computador com o software (FIGURA 3), apresenta custo bastante elevado.

**Figura 3** - Microscópio acoplado à câmera de vídeo capaz de gerar imagens por meio das quais os parâmetros de motilidade são calculados pelo CASA.



Fonte: Do autor (2017).

Para a realização da quantificação do movimento das células espermáticas, o sistema utiliza pelo menos doze características da motilidade, oferecendo altos níveis de confiança, objetividade e repetibilidade nas avaliações (AMANN; KATZ, 2004; RURANGWA et al., 2001). O *software* reconhece o espermatozoide e desenha uma sequência completa de sua movimentação, ou seja, reconstrói sua trajetória e classifica-a conforme padrões definidos como:

móvel não progressivo, progressivo lento, progressivo rápido e imóvel. Todas as variações se relacionam com o processo de capacitação e fertilização e podem prever o potencial reprodutivo de um indivíduo (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN; 2002; VIVEIROS, 2010).

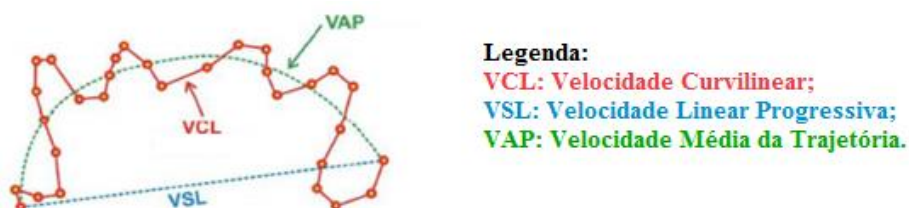
Além disso, o CASA é capaz de analisar diferentes características do movimento espermático e oferecer parâmetros de motilidade tal qual a velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e a velocidade média do percurso (VAP) (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN; 2002), como descritos na Tabela 1 e Figura 4.

**Tabela 1** - Parâmetros de motilidade avaliados pelo sistema CASA.

Parâmetros	Unidade	Descrição
VCL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade da trajetória real do espermatozoide;
VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide;
VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidade da trajetória média do espermatozoide.

Fonte: Matos et al. (2008).

**Figura 4** - Esquema das velocidades espermáticas avaliadas pelo CASA.



Fonte: Adaptado de Taffarel (2013).

O CASA foi inicialmente utilizado na década de 40 para avaliação do sêmen de humanos e, posteriormente, de outros mamíferos. Os primeiros estudos com sêmen de peixes foram realizados somente na década de 80, utilizando-se a espécie *Oncorhynchus myki*, conhecida popularmente como truta arco-íris, em que avaliaram a motilidade dos espermatozoides através de iluminação estroboscópica e câmera de vidro (COSSON et al., 1985).

A diferença entre os espermatozoides de peixes e mamíferos pode explicar o atraso na adequação de ferramentas para análise da motilidade de peixes (MATOS et al., 2008). Para que haja aplicação do sistema, são necessárias definições que se baseiam em características como tamanho, forma e trajetória de natação da célula espermática de cada espécie avaliada (YANG; TIERSCH, 2011).

### **2.2.2 Anomalias espermáticas**

Alterações ultraestruturais dos espermatozoides podem influenciar diretamente na redução de sua motilidade e conseqüentemente na sua capacidade de fertilização (STREIT-JR. et al. 2008). A análise é feita através da observação dos espermatozoides em microscopia de luz e as alterações são classificadas de maneira subjetiva (MELO-MACIEL et al., 2012). Em mamíferos, reprodutores que apresentam anomalias espermáticas maiores que 40% para equinos, 30% para bovinos, 20% para ovinos, caprinos e suínos, são considerados inviáveis e não devem ser utilizados em programas de reprodução (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA, 1998). Para peixes, considera-se que a porcentagem crítica de anomalias espermáticas para fecundação seja de 50% (MILIORINI et al., 2011).

Diversos são os fatores que causam defeitos morfológicos nos espermatozoides de peixes. Alguns acometem os reprodutores durante o

processo de espermatogênese, como restrição alimentar, consanguinidade e estresse ambiental. Outros são resultantes de procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen, como massagem abdominal e o tipo de hormônio aplicado no reprodutor, e da confecção das lâminas para avaliação das anomalias (MILIORINI et al., 2011).

As anomalias podem ser divididas em: Cabeça degenerada, isolada normal, macro e microcefalias; gotas citoplasmáticas proximal e distal; peça intermediária degenerada (PID); cauda curta, dobrada, enrolada e quebrada (MARIA et al., 2012).

### **2.2.3 Concentração espermática**

A concentração de espermatozoides tem sido tradicionalmente utilizada como um dos parâmetros de avaliação da qualidade seminal de peixes. Ela expressa a quantidade de células espermáticas por volume de sêmen e pode ser determinada através de um método comum, com a utilização da câmara hematómica de Neubauer, ou, alternativamente, utilizando-se Câmara de Makler (RAVINDER et al., 1997), espectofotometria (CIERESZKO; DABROWSKI, 1993) ou espermatócrito (LIN; CIERESZKO; DABROWSKI, 1996).

O cálculo da concentração é realizado, mais apropriadamente, em número de células espermáticas por ml, pois permite a complementação pelo volume total de sêmen. Segundo Carvalho (2001), a concentração permite que o sêmen seja otimizado em processos de desova induzida de peixes frequentemente utilizados em laboratórios de reprodução, evitando-se a proporção inadequada de espermatozoide:ovócito.

Sêmen com alta concentração nem sempre se relaciona com taxas de motilidade e fertilização elevadas (GEFFEN; EVANS, 2000), ou seja, o valor da

concentração espermática não é uma medida específica da capacidade fertilizante, visto que apresentam variações que podem ser resultantes de diferenças entre espécies, peso, idade do animal, frequência de coleta, método de indução e época do ano (MURGAS et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

Ampla variação tem sido observada para os valores da concentração espermática de peixes de água doce, inclusive quando se referem a uma mesma espécie. Para curimba, Viveiros e Leal (2016) observaram valores de concentração espermática variando de 10,6 a 55,2 espermatozoides x  $10^9$ /ml, números bem maiores que os encontrados por Kavamoto e Silveira (1997) e Carvalho (2012), em que observaram médias de 26,18 espermatozoides x  $10^6$ /ml e 41,38 espermatozoides x  $10^7$ /ml, respectivamente.

### **2.3 Criopreservação do sêmen**

Técnicas que permitam a conservação de gametas de peixes por tempo prolongado estão sendo cada vez mais requisitadas no processo de fertilização artificial e vêm de encontro a questões econômicas e ecológicas (MARQUES; GODINHO, 2004). Dessa maneira, busca-se aprimorar os procedimentos que possibilitem o prolongamento do tempo de vida útil de gametas (MURGAS et al., 2004) e, dentre as técnicas de conservação mais utilizadas atualmente, a criopreservação dos espermatozoides tem se destacado.

A criopreservação consiste de procedimentos que permitem o armazenamento de material biológico em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$  negativos) por tempo indeterminado, e tem sido utilizada com sucesso na conservação do sêmen de diversas espécies de peixes, incluindo aquelas que são nativas do Brasil (CARVALHO, 2012; FELIZARDO et al., 2010). A técnica apresenta relativa simplicidade, porém altos custos de implantação e manutenção (TSAI; LIN, 2012).

Após o processo de congelamento e descongelamento, os espermatozoides são capazes de recuperar a motilidade espermática e a capacidade de fertilização, ou seja, nesta temperatura a estrutura e funcionalidade do espermatozoide são mantidas viáveis e reversivelmente inativas metabolicamente (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011; PEGG, 2007). Essa característica torna o método seguro na preservação de recursos genéticos, face o alto risco de extinção de algumas espécies, provocadas, principalmente, por ações antrópicas prejudiciais ao ambiente (MURGAS et al., 2004).

Além de possibilitar a conservação de material genético de espécies ameaçadas, várias são as aplicações da criopreservação de sêmen para a piscicultura. Dentre elas, incluem-se: a) Eliminação do problema causado pela assincronia reprodutiva entre fêmeas e machos; b) Economia de sêmen através da utilização do volume total disponível, principalmente quando ele é de difícil obtenção ou quando é liberado em pequenas quantidades; c) Redução de custos referentes à manutenção de reprodutores machos; d) Possibilidade de induzir somente a reprodução das fêmeas, uma vez que o sêmen criopreservado poderá ser utilizado para fertilizar os ovócitos; e) Utilização do número adequado de machos na produção de alevinos, evitando-se ou reduzindo-se a endogamia; f) Facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético; g) Facilidade e baixo custo no transporte de material genético sem perda de viabilidade (CABRITA et al., 2010; MILIORINI, 2006; RIBEIRO; GODINHO, 2003).

Entretanto, estudos têm demonstrado que o sêmen de peixes de água doce criopreservados exibem qualidade inferior ao sêmen *in natura*, apresentando 40 a 90% de injúrias celulares. Essas injúrias podem ser decorrentes do processo de congelamento e descongelamento ou da adição de soluções crioprotetoras que alteram a osmolaridade do meio extracelular (KOPEIKA; KOPEIKA; ZHANG, 2007).

### 2.3.1 Danos causados ao espermatozoide pela criopreservação

A colocação do sêmen diretamente no nitrogênio líquido faz com que a membrana plasmática e a peça intermediária do espermatozoide fiquem inteiramente danificadas. Em contrapartida, se colocado primeiramente em vapor de nitrogênio líquido, há um congelamento gradual do espermatozoide e pouca modificação de suas membranas, apesar de a cromatina ser consideravelmente alterada (BILLARD, 1983).

Durante o processo de congelamento, a temperatura a que o sêmen é exposto altera-se amplamente, variando desde a ambiente (26°C) até a extrema (-196°C). Os maiores danos ao espermatozoide ocorrem em dois momentos distintos: na temperatura de 5°C, quando a membrana plasmática transita do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996); e entre -5 e -15°C, quando ocorre a formação de cristais de gelo no meio externo (cristalização). A formação desses cristais é deletéria porque parte da água do meio extracelular será utilizada para formá-los, e a desidratação resultante tornará o meio progressivamente mais concentrado (hiperosmótico) em relação ao espermatozoide. Na tentativa de equilibrar os meios, haverá um efluxo de água do meio intracelular das células e, a partir desse momento, os eventos que ocorrerão serão determinados pela velocidade do congelamento (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2011; MEDEIROS et al., 2002; SOARES; GUERRA, 2009).

Quando o congelamento é suficientemente lento, a célula perde água rapidamente, desidrata e encolhe. Contudo, se a célula ainda não congelada fica exposta ao meio cada vez mais concentrado por tempo prolongado, causará desidratação excessiva, com conseqüente desnaturação das macromoléculas e crenação celular, podendo levar ao colapso total da membrana. Esses efeitos são chamados de “efeitos de solução” e recebem este nome porque a célula fica



exposta a resíduos altamente concentrados tanto do meio intra quanto extracelulares (MEDEIROS et al., 2002; WATSON, 1995).

De maneira contrária, se ocorre um congelamento muito rápido das células, elas tornam-se incapazes de perder água rapidamente para manter o equilíbrio entre os meios. Com isso, a água se torna super-resfriada e posteriormente congela, levando à formação de cristais de gelo intracelulares que, com o descongelamento, poderão se recrystalizar em cristais maiores, causar danos mecânicos às células, e conseqüentemente, torna-las inviáveis (PEGG, 2007; WATSON, 1995).

Conclui-se, portanto, que a curva ótima de congelamento deverá ser lenta o suficiente para permitir a desidratação dos espermatozoides e prevenir a formação de gelo intracelular, e rápida o suficiente para que o tempo de exposição dos espermatozoides ao soluto não seja muito elevado (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012; SILVA; GUERRA, 2011; WATSON, 1995). Para que haja sucesso, então, as taxas de resfriamento devem situar-se entre -10 e -50°C/min, resultado assegurado com a utilização de botijões do tipo *dry-shipper*, que contém exclusivamente vapor de nitrogênio líquido (HARVEY; CAROLSFELD, 1993).

Danos adicionais também observados durante a criopreservação são aqueles oriundos de alterações morfológicas. A adição de crioprotetores e diluentes ao sêmen gera uma mudança na osmolaridade do meio que circunda os espermatozoides, podendo resultar no rompimento da membrana plasmática, desaparecimento de mitocôndrias, deformação estrutural de organelas, espiralização, adesão ou ruptura do axonema, dentre outras que levarão a deficiências funcionais e à redução da motilidade e da capacidade de fertilização (MARQUES, 2001).

### 2.3.2 Soluções diluidoras e crioprotetoras do sêmen de peixes

O sucesso na manutenção da sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de criopreservação dependerá do protocolo utilizado e, principalmente, das soluções que serão acrescidas ao sêmen antes do procedimento de congelamento. Essas soluções contêm, normalmente, um diluidor, um crioprotetor extracelular impermeável e um crioprotetor intracelular permeável, tornando fundamental o conhecimento a respeito da composição e funcionalidades de cada um desses componentes (MAISSE et al., 1998).

Os diluidores são substâncias utilizadas para proporcionar um meio osmótico e nutricional adequado para os espermatozoides durante a criopreservação. Eles aumentam o volume total do sêmen, reduzindo a concorrência das células por oxigênio e espaço e facilitando a ação do crioprotetor, além de permitir a divisão em doses inseminantes (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; MUCHLISIN, 2005). No geral, os diluidores deverão ser isotônicos, para que a motilidade espermática não ative previamente; estáveis, para que suas características físico-químicas sejam mantidas quando em contato com o sêmen; estéreis, para impedir a contaminação das células; apresentar alta condutividade térmica, para possibilitar a transferência do calor entre o meio externo e os espermatozoides; e funcionarem como carreadores de crioprotetores (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

Inúmeras soluções têm sido testadas como diluidoras para sêmen de peixes, entre elas soluções simples a base de glicose e NaCl, ou complexas, como o diluidor BTS, do inglês *Beltsville Thawing Solution* (BTS Minitüb®). O BTS é um meio diluidor comercial de baixo custo, inicialmente empregado em pesquisas com sêmen suíno, que apresenta resultados expressivos quando aplicado em experimentos com algumas espécies de peixes (FELIZARDO et al., 2010; MILIORINI et al., 2011). Sua fórmula compõe-se de glicose, citrato de

sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), carbonato ácido de sódio, cloreto de potássio e sulfato de gentamicina.

Os crioprotetores, por sua vez, são substâncias adicionadas ao meio diluidor do sêmen com função de preservar a integridade celular no processo de congelamento e descongelamento, devendo apresentar características como baixa toxicidade e alta solubilidade em água (MARIA, 2005). A classificação dos crioprotetores é dada de acordo com a interação existente entre eles e a membrana citoplasmática, assim como pelas suas propriedades físico-químicas (principalmente o peso molecular) (LEUNG, 1991), dividindo-os em intracelulares (permeáveis ou solúveis) e extracelulares (impermeáveis ou insolúveis) (TABELA 2).

**Tabela 2** - Classificação dos crioprotetores quanto à sua capacidade de travessia da membrana celular.

<b>Intracelulares (solúveis)</b>	<b>Extracelulares (insolúveis)</b>
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Glicose
Glicerol	Sacarose
Metanol	Gema de ovo
Etilenoglicol	Leite desnatado
Propilenoglicol	Soro
Propanodiol	Água de Coco
Metilglicol	

Fonte: Cruz (2001); Viveiros e Godinho (2009).

Os crioprotetores intracelulares apresentam baixo peso molecular, são permeáveis à membrana, e têm como função reduzir o ponto de congelamento intracelular, evitando, ou diminuindo a formação de microcristais de gelo no interior das células. Em contrapartida, os crioprotetores extracelulares apresentam alto peso molecular, são incapazes de atravessarem a membrana, e

por essa razão, atuam como estabilizadores e reparadores externos da membrana celular (WATSON, 1995).

Os crioprotetores internos protegem alvos como as enzimas lábeis e proteínas em soluções aquosas (MARIA, 2005). Todavia, há um grande risco na utilização desses, especialmente quando em elevadas concentrações, dado que promovem a desnaturação proteica, principalmente sob altas temperaturas, causando toxicidade nos sistemas enzimáticos e, por conseguinte, celulares (CHAO, 1991; CRUZ, 2001).

A combinação entre crioprotetores internos e externos é conveniente e indicada (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; GODINHO, 2000). A escolha do crioprotetor mais apropriado para a espécie de interesse deverá ser feita por testes de toxicidade (BEDORE, 1999).

Estudos com criopreservação de sêmen de peixes nativos ainda estão em fase de testes quanto à capacidade fertilizante em larga escala. Muitos protocolos para congelamento de sêmen de peixes Neotropicais foram desenvolvidos e publicados, mas muito ainda precisa ser feito para aprimorar essa tecnologia, principalmente no que diz respeito aos parâmetros bioquímicos de motilidade dos espermatozoides.

### **2.3.3 Atividade antioxidante no plasma seminal**

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons não pareados. Essa condição torna-os altamente instáveis e ávidos por elétrons, podendo levar outras moléculas à oxidação e, em consequência, gerar danos celulares. Espécies reativas de oxigênio (ERO's) e de nitrogênio (ERN's) são exemplos de radicais livres. Quando presentes em concentrações adequadas desempenham papel benéfico na fisiologia celular, atuando, por exemplo, como mecanismo inflamatório de defesa contra microrganismos, ou como

sinalizadoras intracelulares, envolvidas em processos normais de proliferação, diferenciação e migração celular (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013; PIANTADOSI, 2008).

Os espermatozoides são capazes de gerar radicais livres por processos fisiológicos normais. Em mamíferos, concentrações ideais de ERO's [peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxilas (OH)] e igualmente de ERN's [(óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)], desempenham papéis críticos na hiperativação e capacitação do espermatozoide, além de promover interação entre a célula espermática e possibilitar a fertilização (BAKER; AITKEN, 2004; LAMIRANDE et al., 1997).

Para evitar o estresse oxidativo e manter a viabilidade celular existem sistemas de defesa compostos por antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas A/E, e enzimáticos (BIRBEN et al., 2012). Estudos envolvendo a caracterização do sêmen de trutua-marrom (*Salmo trutta*), lota (*Lota lota*), perca (*Perch flavitus*) e alburno (*Alburnus alburnos*) revelaram certo padrão na presença de enzimas antioxidantes nas espécies citadas, apresentando o sistema formado por catalase, glutathione redutase, peroxidase e superóxido desmutase, além de metabólitos antioxidantes como ácido ascórbico, glutathione, metionina e ácido úrico (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

Se as ERO's são produzidas excessivamente, acumulam-se na célula, tornando o espermatozoide vulnerável a danos em seus componentes celulares, como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989). Tem sido demonstrado que as células espermáticas expostas a técnicas de criopreservação produzem elevadas concentrações de ERO's (AGARWAL; SAID, 2005; DU-PLESSIS et al, 2008).

Quando os danos são direcionados aos lipídeos da membrana da célula espermática, ocorre uma cascata de eventos bioquímicos denominados de

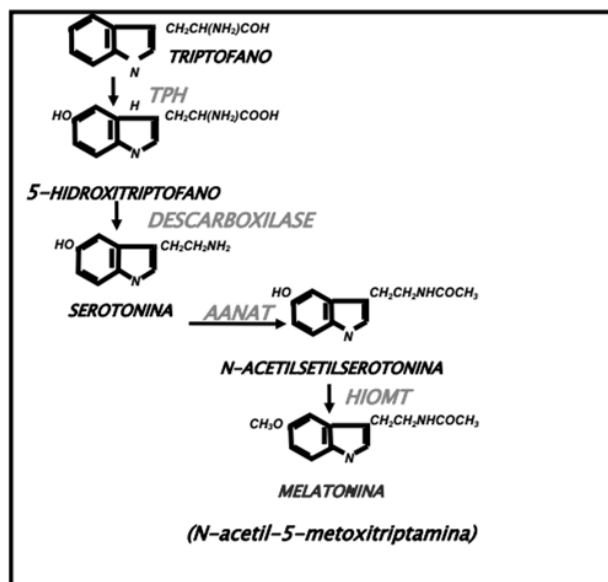
peroxidação lipídica. Esta membrana é susceptível ao ataque das ERO's devido à elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes nelas. O processo de peroxidação irá acarretar em alterações na estrutura e permeabilidade da membrana celular, podendo alterar a sua permeabilidade e seletividade, permitir o fluxo de íons e outras substâncias tóxicas, o que acarretará na perda de função e, em condições extremas, morte celular (BILODEAU et al., 2002).

Elevados níveis de ERO's também são responsáveis por causar danos como diminuição da motilidade dos espermatozoides, inativação de enzimas glicolíticas e oxidação do DNA, podendo tornar a célula espermática incapaz de fertilizar o ovócito (GIL-GUZMAN et al., 2001). A adição de um antioxidante ao extensor de sêmen pode reduzir a sua produção, prevenir o estresse oxidativo e, como consequência, aumentar a qualidade do esperma após o processo de congelação-descongelação (BERRA; RIZZO, 2009).

### **2.3.1.1 Melatonina**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido principalmente na glândula pineal, a partir de uma série de reações iniciadas pela hidroxilação do aminoácido essencial triptofano e sequenciadas pela atividade das enzimas arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e hidroxindol-orto-metiltransferase (HIOMT) (CIPOLLA-NETO et al., 1999; KLEIN et al., 1997) (FIGURA 5). Devido às suas características anfifílicas, que a torna altamente solúvel e capaz de atravessar com facilidade as membranas celulares, após a sua produção a melatonina difunde-se imediatamente para o meio, uma vez que não necessita ser armazenada em vesículas no citoplasma dos pinealócitos (VANECEK, 1998).

**Figura 5 - Biossíntese da melatonina.**



Legenda: TPH: triptofanohidroxilase; AANAT: arilalquilamina; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase.

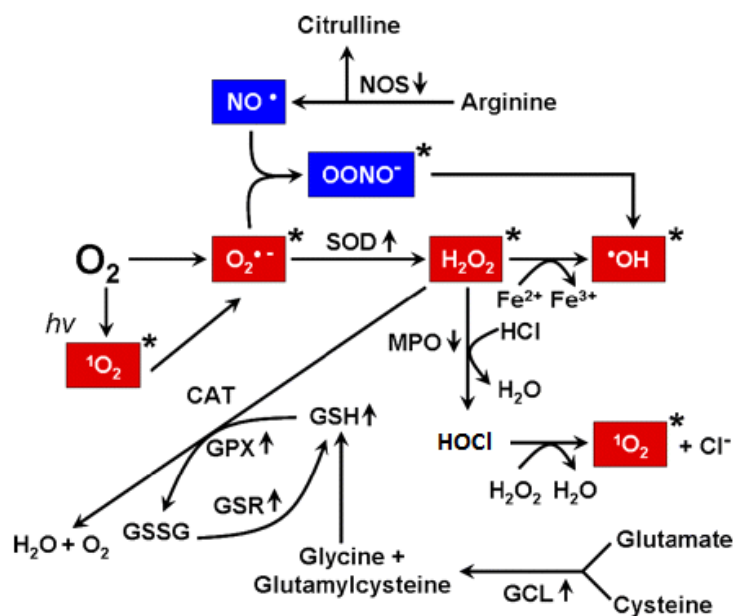
Fonte: Matos (2014) - Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche (2008).

Por muito tempo acreditou-se que a melatonina era exclusivamente sintetizada na glândula pineal e responsável pela regulação dos ritmos circadianos e da reprodução sazonal (REITER, 1991). Entretanto, a presença de enzimas-chave e de receptores para essa indolamina em diferentes tecidos, como fígado, testículos e retina, juntamente com a descoberta de suas propriedades antioxidantes, anti-tumorais e anti-inflamatórias, levaram os cientistas a classificarem-na como uma molécula multitarefa (REITER, FUENTES-BROTO; TAN et al., 2003; YIE et al., 1995).

No estudo realizado por Tan et al. (1993), utilizando um sistema *in vitro* acelular, demonstrou-se que a melatonina era capaz de sequestrar radicais livres altamente reativos, visto que neutralizou o radical hidroxila (OH), considerado como o radical mais reativo em sistemas biológicos, com maior eficiência que a glutatona reduzida (antioxidante endógeno) e o manitol (antioxidante observado

em plantas). Desde então, estudos vem confirmando que esta molécula e seus metabólitos reduzem o estresse oxidativo *in vitro*, seja através da eliminação direta de reagentes a base de oxigênio (ERO's) e nitrogênio (ERN's) (PEYROT; DUCROCQ, 2008; TAN et al., 2007), ou estimulando a atividade de diferentes enzimas antioxidantes (REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004) (FIGURA 6).

**Figura 6** - Reagentes e enzimas antioxidantes que sofrem ação da melatonina.



Legenda: Em vermelho: reagentes à base de oxigênio. Em azul: reagentes à base de nitrogênio. \*: reagentes eliminados diretamente pela melatonina; (↑): enzimas antioxidantes estimulados pela melatonina; (↓) enzimas pró-oxidativas inibidas pela melatonina. GSH: glutaciona; GSR: glutaciona redutase; GPX: glutaciona peroxidase; SOD: superóxido desmutase; CAT: catalase; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; MPO: mieloperoxidase; GCL: glutamilcisteíniligase; O2: oxigênio molecular; O2•-: radical superóxido; ONOO•: peroxinitrito; OH: radical hidroxila; GSSG: glutaciona oxidada; H2O2: peróxido de hidrogênio. Fonte: Reiter et al. (2009).



Diversos estudos foram desenvolvidos visando avaliar o efeito da adição de melatonina endógena ao meio crioprotetor do sêmen de mamíferos e, de maneira geral, apresentaram resultados satisfatórios. Entretanto, os autores têm demonstrado que a melatonina age de forma dose-dependente, além de variar de acordo com a espécie, tempo e modo de incubação e armazenamento (GHAZALEH et al., 2015; LI et al., 2011; PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013). Para peixes ainda não foram publicados dados referente à utilização deste antioxidante no sêmen.

#### **2.4 Descongelamento do sêmen de peixes**

Particularidades na composição seminal de diferentes espécies são comuns, o que faz com que a determinação da velocidade e temperatura ideais de descongelamento seja obtida via ensaios experimentais (AGOSTINHO et al., 2003). No geral, procedimentos que envolvem altas temperaturas com intervalos reduzidos de exposição são bem sucedidos (PAULINO, 2009).

Diferentemente do congelamento do sêmen em que ocorre desidratação das células, no descongelamento ocorrerá reidratação celular através do influxo de água para o meio intracelular (HOLT, 2000). O processo de descongelamento deverá ser realizado rapidamente para impedir que os microcristais de gelo se reagrupem e causem danos graves às células, tornando-as inviáveis (PEGG, 2007).

A utilização de baixas temperaturas implica em lentidão no processo de descongelamento. Contudo, superaquecimentos também devem ser evitados, pois causam a desnaturação de enzimas. Os protocolos mais eficientes em manter a qualidade dos parâmetros seminais após o descongelamento utilizam-se de temperaturas que variam entre 30 e 60°C (CARNEIRO, 2007; MARIA, 2005).

O procedimento consiste na retirada da palheta com sêmen congelado do botijão de nitrogênio e a imediata imersão desta em banho-maria, agitando-a lentamente em água aquecida para permitir que o descongelamento seja uniforme (CRUZ, 2001).

## **2.5 Capacidade de fertilização do sêmen de peixes**

A técnica de fertilização artificial de gametas é o método que apresenta os melhores resultados, do ponto de vista prático, quanto à qualidade seminal. Ela permite que os gametas sejam melhores aproveitados, aumentando-se o número de ovos e embriões viáveis. Além disso, possibilita que o sêmen de um mesmo animal seja utilizado para fertilizar ovócitos de diferentes fêmeas (BILLARD, 1990), sendo implantada em larga escala, principalmente por programas comerciais e de repovoamento de rios.

A quantidade de gametas masculinos produzida pelos peixes varia com a espécie. Porém, de maneira geral, essa produção chega a ser dez vezes maior que a de mamíferos (BILLARD, 1990), o que pode ser devido ao elevado número de espermatozoides necessários para fertilizar um ovócito, haja vista que a distância capaz de ser percorrida por eles é menor que todo o diâmetro do gameta feminino (BILLARD; COSSON, 1992).

A fertilização na maioria dos teleósteos é externa. Como consequência, quando ocorre reprodução artificial, os ovócitos são colocados diretamente em contato com os espermatozoides e homogeneizados com um ativador. Para que haja sucesso na fertilização, dois fatores se tornam essenciais e limitantes: a duração da motilidade e o tempo que a micrópila permanece aberta. Quando uma baixa proporção de espermatozoides é utilizada para fertilizar o ovócito indica que a capacidade de fertilização da espécie é elevada (RURANGWA et al., 1998), mas deve ser salientado que quando a fertilização envolve sêmen

criopreservado a proporção é normalmente aumentada, quando em comparação ao sêmen *in natura*, devido a diminuição dos padrões de qualidade do sêmen descongelado.

O processo de congelamento, como anteriormente citado, induz muitos danos aos espermatozoides e, mesmo que esses apresentem motilidade evidenciada, podem apresentar alguma alteração morfológica que os impeça de penetrar o ovócito ou de seguir com o desenvolvimento embrionário. A partir do processo de fertilização artificial após o descongelamento do sêmen é possível verificar a viabilidade da solução crioprotetora e do protocolo de criopreservação utilizado. Entretanto, durante esse procedimento, outros fatores podem influenciar nos resultados, como, por exemplo, a quantidade inadequada de solução ativadora adicionada para homogeneização do espermatozoide com o ovócito; se em grande quantidade, dilui excessivamente o sêmen e dificulta o encontro da micrópila pelos espermatozoides; se em pequeno volume, permite que o muco ovariano ou o contato entre os ovócitos obstrua a micrópila e conseqüentemente a entrada do espermatozoide (CIERESZKO; DABROWSKI, 1994; SHIMODA et al., 2007; WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

Considera-se, portanto, que a taxa de fertilização funciona como um ótimo parâmetro de avaliação da qualidade seminal e é requisito imprescindível para tornarem válidas as técnicas empregadas em estudos de reprodução de peixes. Quanto maior o número de ovos e embriões viáveis após o descongelamento do sêmen, maior a eficácia das soluções crioprotetoras utilizadas e do método de congelamento empregado. No entanto, fica a incerteza se a avaliação desse parâmetro pode ser feita de forma isolada, dado que pode ser influenciada por uma série de condições, como qualidade da fêmea e temperaturas da água de incubação e oxigenação (CIERESZKO; DABROWSKI, 1994; RANA; McANDREW, 1989; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

As soluções acrescidas ao sêmen de peixes antes do processo de criopreservação influenciam amplamente na taxa de ativação espermática pós-descongelamento. Quando o protocolo adotado não é adequado para a espécie, leva à redução nos parâmetros de motilidade e a alterações morfológicas nos espermatozoides desta, tornando-os incapazes de fertilizar o ovócito.

Estudos sobre o efeito de diferentes antioxidantes combinados às soluções crioprotetoras permitirão aperfeiçoar os protocolos de criopreservação existentes. O sucesso dessa combinação trará benefícios econômicos, mas, principalmente, ecológicos, visto que será eficiente na conservação de material genético de espécies ameaçadas de extinção por tempo prolongado.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **British Journal of Urology**, London, v. 95, n.4, p. 503–507, Mar. 2005.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007, p. 501.
- AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory fish of upper Paraná River basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J. et al. (Eds.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries, and conservation status**. Victoria, Canada: World Fisheries Trust, 2003. p. 19-99.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, New York, v. 40, n. 6, p. 183-197, June 1989.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology international**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology Lab Corner\*: Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 317-325, May 2004.
- ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 139, n. 1/4, p. 25-30, June 2013.
- BAKER, A.; AITKEN, R. J. A. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Molecular And Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 216, n. 1/2, p. 47-54, Mar. 2004
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. 470 p.
- BARLETTA, M. et al. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 76, n. 9, p. 2118-2176, June 2010.

BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**, 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

BERRA, B.; RIZZO, A. M. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. **Clinics In Dermatology**, London, v. 27, n. 2, p. 202-209, Mar./Apr. 2009.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 26, n.4, p. 877-920, 1986.

\_\_\_\_\_. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING, G. E. (Ed.). **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4. ed. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, 1990. p. 183-213.

\_\_\_\_\_. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, Jan. 1983.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal Of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p.122-131, Feb. 1992.

BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.

BILODEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, Feb. 2002.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, New York, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan. 2012.

BOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M. Family Heptapteridae (Heptapteridus). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. (Org.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2003. p. 406-431.

BORELLA, M. I. et al. Gametogênese e o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Eds.). **Biologia e**

**fisiologia de peixes neotropicais de água doce.** Jaboticabal: Funep, 2014. p. 285-305.

BURNESS, G.; MOYES, C. D.; MONTGOMERIE, R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*).

**Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 140, n. 1, p. 11-17, Jan. 2005.

CABRITA, E. et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal Of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 623-635, Set. 2010.

CANEPPELE, D. *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. 2011. 60 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) – Instituto de Pesca, São Paulo, 2011.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista brasileira de reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, Jul./Set., 2007.

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

CARVALHO, A. F. S. **Criopreservação do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*):** predição de potencial de congelabilidade e uso da cafeína na solução ativadora. 2012. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CARVALHO, A. M. R. **Criopreservação do sêmen da piapara (*Leporinus elongatus*).** 2001. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia dos Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CHAO, N. H. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: technology advancement and extension efforts. **Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica**, California, v. 16, p. 263-283, June 1991.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 367-373, Feb. 1993.

\_\_\_\_\_. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 12, n. 5, p. 357-367, 1994.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P.M. (Eds.) **Cryopreservation in Aquatic Species**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p. 21-48.

CIPOLLA-NETO, J. et al. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. **Neuroendocrinology**, London, v. 69, n. 2, p. 97-104, Feb. 1999.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 982-990.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

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.

CÓSER, A. M.; GODINHO, H. P.; RIBEIRO, D. M. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, April 1984.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal Of Fish Biology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 240-279, Jan. 2010.

COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. p. 162-186.

\_\_\_\_\_. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal Of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p.460-486, Aug. 2008.

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



- CRUZ, V. L. B. **Criopreservação de sêmen de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) (Characiformes, Prochilodontidae)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- DU-PLESSIS, S. S. et al. Impact of oxidative stress on IVF. **Expert Review of Obstetrics and Gynecology**, London, v. 3, n. 4, p. 539-554, July 2008.
- FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p.259-263, Dec. 2010.
- FRANCISCATTO, R. T. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, Jul/Set. 2002.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Eds.) **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97-140.
- GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilization success of male and Sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, Feb. 2000.
- GHAZALEH, I. et al. Melatonin Has a Beneficial Effect on Stallion Sperm Quality in Cool Condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Champaign, v. 35, n. 7, p. 555-559, July 2015.
- GIL-GUZMAN, E. et al. Differential production of reactive Oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, Sept. 2001.
- GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agopecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, Mar./Abr. 2000.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice**, New York, v. 12, n. 1, p.131-147, April 1996.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Eds.) **Induced breeding in tropical fish culture**. Ontario: International Development Research Center, 1993. p. 119-130.

HE, S.; KEERAN-JENKINS, K.; WOODS, C. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 61, n. 7, p. 1487-1498, May 2004.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.

HU, J. et al. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchonioides*. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 72, n. 5, p. 704-710, Sept. 2009.

INGERMANN, R. L. Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. In: ALAVI, S. H. M. et al. (Eds.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International Ltd, 2008. p. 241-266.

JEPSEN, D. B.; WINEMILLER, K. O.; TAPHORN, D. C. Temporal patterns of resource partitioning among Cichla species in a Venezuelan blackwater river. **Journal of Fish Biology**, London, v. 51, n. 6, p. 1085-1108, Dec. 1997.

KAVAMOTO, E. R.; SILVEIRA, W. S. Produção espermática de curimatá *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 24, n. 2, p.73-78, Jul. 1997.

KLEIN, D. C. et al. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 52, p. 307-357, May 1997.

KOH, I. C. C. et al. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 3, p. 263-267, Dec. 2010.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J.; ZHANG, T. Sperm cryopreservation of fish. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols. Series: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2007. v. 368, p. 203-217.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1/2, p. 130-140, Sept. 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 3/4, p. 314-321, June 2010.

LAHNSTEINER, F., PATZNER, R.A. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: ALAVI, S. M. H. et al. (Eds.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International International, 2008. p. 1–61.

LAMIRANDE, E. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, Colchester, v. 2, n. 1, p. 48-54, Jan. 1997.

LEUNG, L. K. P. Principles of biological cryopreservation. In: JAMIESON, G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: University Press, 1991. p. 231-244.

LI, X. X. et al. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm. **Reproduction In Domestic Animals**, New York, v. 47, n. 2, p. 299-307, July 2011.

LIN, F.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm production and cryopreservation in muskellunge after carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin injection. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 58, n. 1, p. 32-37, Jan. 1996.

LOGATO, P. V. R. Nutrição e alimentação de peixes de água doce. Viçosa: **Aprenda Fácil**, 2000. 128 p.

MAISSE, G. et al. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. **INRA Productions animales**, Paris, v. 11, n. 1, p. 57-65, May 1998.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2005.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 8 p.

MARIA, A. N. et al. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, v. 20, n.1, p. 39–43, Feb. 2012.

\_\_\_\_\_. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 779-783, Sept. 2010.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p.799-804, Sept. 2004.

MARTÍN-HIDALGO, D. et al. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, Stonehan, v. 75, n. 8, p. 1550-1560, May 2011.

MATOS, D. L. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, Out./Dez. 2008.

MATOS, R. A. **Efeitos da melatonina pineal sobre a neurogênese de ratos submetidos ao treinamento físico aeróbio**. 2014. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 1, p. 327-344, Jan. 2002.

MELO-MACIEL, M. A. P. et al. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. **Ciência Animal**, Goiania, v. 22, n. 1, p. 269-283, Jun. 2012 – Edição Especial.

MILIORINI, A. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 177-187, Nov. 2011.

MORISAWA, M. Fine structure of spermatozoa of the Hagfish *Eptatretus burgeri* (Agnatha). **The Biological Bulletin**, Chicago, v. 189, n. 1, p. 6-12, Aug. 1995.

MORISAWA, M. et al. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic to clinical applications**. Vienna: IL: Cache River Press, 1999. p. 149–160.

MUCHLISIN, A. Z. Review: Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. **Biodiversitas**, v.6, n.1, p. 12-15, Jan. 2005.

MURGAS, L. D. S. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, Maio 2011.

\_\_\_\_\_. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, Dez. 2004.

MURGAS, L. D. S. et al. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE. Lavras, 2003. p. 28. (Curso Lato Sensu. Qualificação Profissional).

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative of Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 516-534, Feb. 2010.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 13, n. 5, p. 349-361, May 2013.

PAULINO, M. S. P. **Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): Técnicas para o descongelamento**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.). **Cryopreservation and Freeze-drying Protocols**, Totowa: Humana Press, 2007. p. 39-57.

PERCHEC-POUPARD, G. et al. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal Of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 2, p. 315-327, Jul. 1997.

- PERUMAL, P.; VUPRU, K.; KHATE, K. Effect of Addition of Melatonin on the Liquid Storage (5°C) of Mithun (*Bos frontalis*) Semen. **International Journal Of Zoology**, Cairo, v. 2013, p. 1-10, Nov. 2013.
- PEYROT, F.; DUCROCQ, C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Pineal Research**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 235-246, Oct. 2008.
- PIANTADOSI, C. A. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 562-569, Sept. 2008.
- RANA, K. J.; McANDREW, B. J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 76, n. 3/4, p. 335-345, Feb. 1989.
- 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.
- REITER, R. J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. **Endocrine Reviews**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 151-180, May 1991.
- REITER, R. J.; FUENTES-BROTO L.; TAN D. X. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in Brain Research**, London, v. 181, n. 127-151, Apr. 2010.
- REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. **Journal of Biomedical Science**, Oxford, v. 7, p. 444-458, June 2000.
- \_\_\_\_\_. Melatonin and Reproduction Revisited. **Biology of Reproduction**, New York, v. 81, n. 3, p. 445-456, May 2009.
- RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo “piau-açu” *Leporinus macrocephalus*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, Jul. 2003.
- RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 1-9, Jan. 2004.
- RURANGWA, E., et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computerassisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n. 3, p. 751- 769, Feb. 2001.

\_\_\_\_\_. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

\_\_\_\_\_. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 402-13, Aug. 1998.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. et al. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 22, n.1, p. 687-690, Jun. 2012 - Edição Especial.

SANCHES, E. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 11, p. 2091-2098, Nov. 2009.

SCHÜLTZ, J. H. **Avaliação de diferentes tipos de alimentos e fotoperíodos no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae)**. 2003. 21 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.  
SHIMODA, E. et al. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 877-882, Ago. 2007.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 370-384, Out./Dez. 2011.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 53-63, Jun. 2009.

STREIT-JR, D. P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus brasiliensis*) em cativo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337-344, Ago. 2008.

SVERLIJ, S.; ROS, A.; ORTI, G. Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del Sabalo *Prochilodus lineatus*. **FAO Sinopsis sobre la pesca**, Rome, v. 154, p. 1-64, 1993.

TAFFAREL, T. R. **Osmolalidade e composição do meio imobilizador durante o resfriamento de sêmen de *Prochilodus lineatus***. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K<sup>+</sup> concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar. 1995.

TAN, D. X. et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **Journal of Pineal Research**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 75-78, Jan. 2003.

\_\_\_\_\_. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine Journal**, Oxford, v. 1, p. 57-60, Jan. 1993.

\_\_\_\_\_. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, Oxford, v. 42, n. 1, p.28-42, Jan. 2007.

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 425-434, May/June 2012.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, New York, v. 78, n. 3, p. 687-721, Jan. 1998.

VEGA-ÓRELLANA, O. M.; FRACALOSI, D. M.; SUGAI, J. K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: weaning and ontogenic development of digestive proteinases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 252, n. 2/4, p. 484-493, Mar. 2006.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Woburn, v.57, n. 1, p. 149-179, Jan. 2002.

VIEIRA, M. J. A . F. et al. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 232, p. 1263-1270, Dec. 2011.

VIVEIROS, A. T. M. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Woburn, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010.



VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 137-150, March 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL M.C. Sperm dilution ratio affects post-thaw motility rate and velocity of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Zygote**, Cambridge, v. 24, n. 5. p. 662-667, Oct. 2016.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 1/2, p. 293-300, June 2009.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, London, v.7, n. 4, p. 871-89, April 1995.

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

WITECK, L. et al. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 3, p. 477-481, Mar. 2011.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983.

YANG, H; TIERSCH, T. R. Application of computer-assisted sperm analysis (CASA) to aquatic species. In: TIERSCH T. R.; GREEN C. (Eds) **Cryopreservation in Aquatic Species**. 2. ed. Los Angeles: World Aquaculture Society, 2011. p. 240–254.

\_\_\_\_\_. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 149, n. 2, p. 224-232, Mar. 2009.

YIE, S. M; NILES, L. P.; YOUNGLAI, V. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Oxford, v. 80, n. 5, p. 1747-1749, May 1995.

## CAPÍTULO 2 Efeito da melatonina no sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)

### RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de diferentes doses de melatonina nos parâmetros de motilidade, morfologia e capacidade de fertilização do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. Para isso, após o tratamento hormonal dos machos com extrato de hipófise de carpa e coleta seminal, foram realizados quatro pools de sêmen, homogêneos a cada dois animais e diluído em soluções contendo: Controle Positivo (C+): BTS (5%) + DMSO (8%), e os tratamentos T1, T2 e T3: BTS (5%) + DMSO (8%) acrescidos de concentrações de 1, 2 e 3mM de melatonina, respectivamente. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml, estas foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (*dry shipper*) e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 12 segundos cinco meses após o congelamento para análises de motilidade e morfologia espermáticas, e um ano após o congelamento para avaliação da taxa fertilização. Os parâmetros de taxa de motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média de percurso (VAP) do sêmen após o descongelamento foram determinados utilizando o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre as taxa de motilidade progressiva e as velocidades (VCL, VSL e VAP) do sêmen criopreservado nos diferentes tratamentos. A taxa de motilidade total apresentou-se maior ( $P < 0.05$ ) nos grupos contendo 1 e 2mM de melatonina quando comparados ao T3, porém não diferiram-se do C+. No que diz respeito à morfologia, a porcentagem de anomalias espermáticas aumentou com o processo de criopreservação ( $P < 0.05$ ). Entretanto, todos os tratamentos apresentaram valores similares de anomalias totais pós-descongelamento e não diferiram entre si quanto à capacidade de fertilização ( $P > 0.05$ ). Conclui-se, portanto, que a adição de melatonina à solução crioprotetora de sêmen de curimba não foi capaz de promover maior viabilidade ao sêmen criopreservado.

**Palavras-chave:** Congelamento. Qualidade Seminal. Antioxidante. CASA.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of different doses of melatonin on the parameters of motility, morphology and fertilization capacity of the cryopreserved semen of *Prochilodus lineatus*. After males' hormonal treatment with carp pituitary extract and seminal collection, four groups were set with the homogenized semen of two animals and diluted in solutions containing: Positive Control (C+): BTS (5%) + DMSO (8%), and the treatments T1, T2 and T3: BTS (5%) + DMSO (8%) plus concentrations of 1, 2 and 3mM of melatonin, respectively. The diluted semen was placed in straws of 0.5 ml, frozen in a cylinder of vapor nitrogen (*dry shipper*) and stored in a nitrogen cylinder. The straws were thawed in a water bath at 40°C for 12 seconds five months after freezing for analysis of sperm motility and morphology, and one year after freezing for evaluation of fertilization rate. The parameters of total and progressive motility rate, curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL) and mean velocity (VAP) of the semen after thawing were determined using the computerized semen analysis system (SCA). The data were submitted to analysis of variance, and the means were compared by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). There were no differences ( $P > 0.05$ ) between the progressive motility rates and the velocities (VCL, VSL and VAP) of the cryopreserved semen in the different treatments. The total motility rate was higher ( $P < 0.05$ ) in the groups containing 1 and 2mM of melatonin when compared to T3, but they did not differ from C+. For morphology analysis, the percentage of sperm abnormalities increased with the cryopreservation process ( $P < 0.05$ ). However, all treatments had similar values after thawing of total anomalies and did not differ in fertilization capacity ( $P > 0.05$ ). In conclusion, with these results it is possible to infer that the addition of melatonin to the cryoprotectant solution of curimba semen was not able to promote greater viability to the cryopreserved semen.

**Keywords:** Freezing. Seminal quality. Antioxidant. SCA.

## 1 INTRODUÇÃO

*Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836), vulgarmente conhecida como curimba, é uma espécie de teleósteo migrador de água doce, nativa da América do Sul. Sua carne é bastante apreciada, sobretudo na região nordeste do Brasil, e suas larvas servem como forrageiras para espécies de peixes carnívoras de grande valor comercial e/ou ameaçadas de extinção (VIVEIROS et al., 2009).

Entretanto, embora a espécie apresente grande importância ecológica e econômica, sua sobrevivência tem sido comprometida pela atividade agrícola inapropriada, introdução de espécies exóticas, sobrepesca e, principalmente, pela perda de habitat devido à construção de barragens de reservatórios que resultam em modificações na qualidade da água, interrupção das rotas migratórias e do acesso aos locais de desova (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007; BARLETTA et al., 2010). Sendo assim, busca-se aprimorar as técnicas que contribuam para uma maior produtividade e conservação da biodiversidade de curimba.

A criopreservação de sêmen é uma técnica amplamente utilizada em pisciculturas comerciais e conservacionistas, e consiste de procedimentos que permitem o armazenamento de sêmen em nitrogênio líquido por tempo indeterminado. A baixa temperatura mantém a estrutura e funcionalidade dos espermatozoides viáveis e reversivelmente inativas metabolicamente (PEGG, 2007). Contudo, o sucesso dessa manutenção dependerá das soluções diluidoras e crioprotetoras acrescidas ao sêmen antes do procedimento de congelamento, visto que a célula espermática fica exposta a condições externas não adequadas fisiologicamente que desencadeiam eventos como estresse osmótico, alterações bioquímicas do plasma seminal, desidratação e cristalização celular e danos oxidativos (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

A diluição nas diferentes soluções diminui a concentração de proteínas (SUQUET et al., 2000) e outros compostos antioxidantes presentes no plasma seminal (CABRITA et al., 2011) que, em concentrações adequadas, exercem importante função na maturação, capacitação e manutenção da viabilidade dos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento (SAPANIDOU et al., 2015). Como consequência, parâmetros importantes para a atividade do espermatozoide, como motilidade e morfologia, são afetados negativamente.

Grande variedade de antioxidantes tem sido utilizada buscando-se diminuir os danos gerados pelo estresse oxidativo, aumentar a qualidade do espermatozoide e sua capacidade de fertilizar o ovócito (JANG et al., 2010; ROCA et al., 2004; SAPANIDOU et al., 2015). Dentre eles, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) tem proporcionado resultados satisfatórios, dada sua eficiência na eliminação direta de reagentes a base de oxigênio e nitrogênio (TAN et al., 2007) e na estimulação da atividade de enzimas antioxidantes, como SOD (superóxido dismutase), GPX (glutaciona peroxidase) e CAT (catalase) (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; PANG et al., 2016).

Embora a melatonina tenha sido descrita como um antioxidante altamente eficiente na manutenção da qualidade seminal de mamíferos (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; GHAZALEH et al., 2015; PANG et al., 2016), estudos com sêmen de peixes ainda não foram desenvolvidos. Visto isso, objetivou-se com este trabalho examinar o papel da melatonina na manutenção dos parâmetros de viabilidade do sêmen criopreservado de curimba.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Locais de realização do experimento e manutenção dos reprodutores**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFLA (CEUA Protocolo N° 039/13). A coleta e o processo de criopreservação do sêmen foram conduzidos no Laboratório da Usina Hidrelétrica de Volta Grande, localizada no município de Conceição de Alagoas - MG, durante os meses de novembro e dezembro de 2015. O descongelamento para análises da qualidade seminal foi realizado no Biotério Central, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, em Lavras – MG, nos meses de maio e junho de 2016. Por fim, a etapa de fertilização utilizando o sêmen congelado foi realizada na Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) na cidade de Itutinga – MG, no mês de dezembro de 2016.

As curimbas foram mantidas em tanques escavados ao longo do ano e alimentadas duas vezes ao dia com ração extrusada (32% proteína bruta). Na época da piracema foram retiradas dos viveiros com o auxílio de redes de arrasto e levadas a tanques de alvenaria dos laboratórios para realização dos procedimentos de indução da reprodução e coleta dos gametas.

### **2.2 Indução hormonal, coleta e avaliação do sêmen *in natura***

A seleção dos animais a serem extrusados foi feita através da observação de características reprodutivas específicas, como papila urogenital hiperêmica nas fêmeas e liberação de sêmen, de coloração branca e clara e aparência densa, após leve massagem abdominal, nos machos. Os peixes selecionados foram marcados e pesados para o cálculo das doses hormonais a serem aplicadas.

Foram aplicadas duas doses, seguindo o protocolo de 0,5 e 5 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) por kg de peso corporal, próximas a nadadeira dorsal dos peixes. O intervalo entre a aplicação da primeira e segunda dose foi de 12 horas.

A coleta do sêmen foi realizada cerca de 8 horas após a segunda dose. Para a realização dessa coleta, as curimbas foram retiradas da água, envoltas em uma toalha e apoiadas em superfície plana. As papilas urogenitais foram secas e limpas com papel toalha para evitar contaminação e ativação prévia do sêmen por fezes, água, sangue ou urina e uma leve massagem na parede celomática, no sentido crânio caudal dos animais, foi aplicada.

Após a coleta, uma alíquota de 10µl do sêmen *in natura* foi depositada em lâmina histológica de vidro e observada em microscópio óptico de luz, sob aumento de 40 dioptrias para verificação de uma possível ativação prévia do sêmen. Quando constatada ausência de movimentação dos espermatozoides, o sêmen era homogeneizado com 40µl de água destilada para avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis e o tempo de duração da motilidade, de forma subjetiva.

Para o congelamento, somente o sêmen de machos que apresentaram taxa de motilidade subjetiva superior a 95% pós-ativação foi utilizado. Foram formados quatro pools, homogeneizados a cada dois animais, e uma amostra de 10µl de cada pool foi retirada e diluída em 990µl de formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 ml de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 ml) para determinação da concentração e morfologia espermáticas do sêmen *in natura*.

### **2.3 Soluções Crioprotetoras**

Para o procedimento de criopreservação foram testadas as soluções:

- Controle positivo (C+): 5% BTS<sup>®</sup> + 8% dimetilsulfóxido (DMSO) (FELIZARDO et al., 2010): 2049 mOsm/kg;
- Tratamento 1 (T1): 5% BTS<sup>®</sup> + 8% DMSO + 1mM de melatonina: 2027 mOsm/kg;
- Tratamento 2 (T2): 5% BTS<sup>®</sup> + 8% DMSO + 2mM de melatonina: 2002 mOsm/kg;
- Tratamento 3 (T3): 5% BTS<sup>®</sup> + 8% DMSO + 3mM de melatonina: 2015 mOsm/kg.

#### **2.4 Congelamento, descongelamento e análise do sêmen criopreservado**

Após a diluição do sêmen nas soluções crioprotetoras contendo melatonina na proporção de 1:4 (sêmen:solução), a solução resultante foi envasada em palhetas de 0,5ml e estas vedadas com massa cirúrgica estéril. As palhetas foram então acondicionadas em raques de polietileno e transferidas para um botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo dryshipper) para resfriamento e congelamento. O resfriamento no botijão em questão consistiu do decréscimo de 35,6 graus por minuto até a temperatura de -170° C. Após 24 horas, as raques foram transferidas para um botijão de armazenamento a -196° C (Cryometal, modelo DS-18), permanecendo submersas em nitrogênio líquido até a data do descongelamento.

O processo de descongelamento consistiu na imersão e leve agitação das palhetas em banho-maria à temperatura de 40°C durante 12s (PAULINO, 2009).



### 2.4.1 Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada utilizando-se câmara de Neubauer. Para isso, 10 $\mu$ l de sêmen de cada pool foram diluídos em 990 $\mu$ l de solução de formol citrato. Em seguida, foram tomados 10 $\mu$ l da amostra diluída e procedida nova diluição em 990  $\mu$ l de solução de formol-citrato, resultando em uma diluição final de 1:10<sup>4</sup> (sêmen:formol citrato).

A concentração final foi estimada pela fórmula:  $CE = N \times FC$ , em que CE representa a concentração espermática (espermatozoides por mm<sup>3</sup>) e N o número de células contadas na câmara de Neubauer. O fator de correção, FC, é dado por  $FC = (q \times fd) / d$ , em que:  $q = 5$  e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de Neubauer (25) e o número de quadrículos contados (5); fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen (= 10<sup>4</sup>); d é a profundidade entre a lamínula e a câmara de Neubauer (= 0,1 mm).

### 2.4.2 Motilidade espermática pós-descongelamento

As análises de motilidade pós-descongelamento do sêmen foram realizadas utilizando-se o software CASA (Sperm Class analyzer® - SCA, 2005, Microptics, S.L., versão 3.2.0). Em um eppendorff contendo 300 $\mu$ l de ativador - NaHCO<sub>3</sub> a 0,7% (PAULINO, 2009) foi adicionada uma alíquota de 10 $\mu$ l de sêmen e homogeneizado. Dessa solução, 2 $\mu$ l foram retirados, colocados em câmara hematimétrica (câmara de Mackler) e imediatamente observados em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Eclipse E200®, Tóquio, Japão), focalizado na objetiva de 200x, com filtro amarelo na posição pH1. Esse microscópio encontrava-se acoplado a uma câmera de vídeo (Blaster Vision Technologies® A602FC, Ahrensburg, Alemanha) que gerava 25 imagens por

segundo, por meio das quais os parâmetros de motilidade foram calculados pelo SCA<sup>®</sup>.

Os parâmetros calculados pelo software foram: motilidade espermática (%), velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu/s$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu/s$ ) e velocidade linear (VSL,  $\mu/s$ ). O tempo de motilidade foi medido com cronômetro e considerado desde a homogeneização do sêmen com a solução ativadora até o momento em que o SCA<sup>®</sup> acusasse 80% de espermatozoides estáticos.

### **2.4.3 Morfologia espermática**

Uma alíquota de 10 $\mu$ l de sêmen descongelado foi diluída em 990 $\mu$ l de solução formol citrato. A seguir, uma fração de 5 $\mu$ l da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica, corada com rosa bengala e levada ao microscópio óptico na objetiva de 100X (STREIT-JR. et al., 2004). O exame consistiu da observação das alterações morfológicas de 200 espermatozoides focalizados em diversos campos ao longo da lâmina. Foram consideradas como anomalias: cabeça degenerada, isolada normal, macro e microcefalias; gotas citoplasmáticas proximal e distal; peça intermediária degenerada (PID); cauda: curta, dobrada, enrolada e quebrada (MARIA et al., 2012).

### **2.5 Fertilização pós-descongelamento**

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada um ano após o congelamento seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente: As palhetas foram imersas e levemente agitadas em banho-maria à temperatura de 40°C durante 12s. 400 $\mu$ l de sêmen de cada palheta foram utilizados para fertilizar 0,4g de ovócitos (aproximadamente 520 ovócitos) da fêmea (Adaptado

de MILIORINI, 2006). A fertilização foi iniciada adicionando-se 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  a 0,7% ao sêmen, juntamente com o ovócito. Os gametas foram então levemente agitados durante dois minutos, gradualmente aclimatados à temperatura da água de incubação e posteriormente transferidos para incubadoras experimentais. A temperatura da água de incubação foi mantida entre 24 e 26°C e a taxa de fertilização foi verificada 8 horas após a inicialização. Para estimar a eficiência da fertilização, duas amostragens individuais de cada incubadora foram realizadas e delas contados cerca de 100 ovos em estereoscópio binocular. A taxa de fertilização média foi dada pela fórmula: Taxa de fertilização (TF) =  $[E / (E + i)] \times 100$ , em que E: número de embriões viáveis; i: número de ovos inviáveis.

## **2.6 Análise Estatística**

As análises foram realizadas por meio do software estatístico R versão 3.2.2. Os dados foram submetidos a teste de normalidade Shapiro-Wilk e, quando apresentaram distribuição normal, foram analisados por ANOVA (One-Way ANOVA). Em caso de significância entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foram transformados por transformação do tipo BoxCox.

### 3 RESULTADOS

O sêmen *in natura* apresentou concentração média de  $32 \pm 13,8 \times 10^9$  espermatozoides/ml, taxa de motilidade subjetiva de  $99,25 \pm 2,45\%$  e duração de  $47,60 \pm 14,10$  segundos.

Os valores médios dos parâmetros de motilidade obtidos pelo programa CASA (TABELA 1), a taxa de fertilização (TABELA 1) e a porcentagem de anomalias morfológicas (TABELA 2) do sêmen criopreservado em soluções contendo diferentes dosagens de melatonina são mostrados a seguir.

Tabela 1 – Parâmetros de motilidade (CASA) e taxa de fertilização do sêmen de curimba após o descongelamento.

Trat.	Mot.	Mot.	Duração (s)	Taxa de
	Total (%)	Progressiva (%)		Fertilização (%)
C+	$67,3 \pm 9,4^a$	$15,2 \pm 9,9$	$269,8 \pm 194,8$	$20,3 \pm 14,6$
T1	$63,1 \pm 18,8^a$	$14,6 \pm 6,8$	$115,3 \pm 27,7$	$39,0 \pm 12,9$
T2	$60,4 \pm 21,1^a$	$14,1 \pm 9,5$	$199,5 \pm 180,5$	$34,9 \pm 13,0$
T3	$30,0 \pm 7,6^b$	$5,0 \pm 5,3$	$54,6 \pm 20,4$	$38,8 \pm 8,7$

<sup>a,b</sup> Letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Legenda: Trat.: Tratamentos; C+: controle positivo sem melatonina; T1: tratamento com 1 mM de melatonina; T2: tratamento com 2mM de melatonina; T3: tratamento com 3mM de melatonina; Mot: Motilidade.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para os tipos de velocidades avaliados pelo CASA (VCL, VSL e VAP). Os tratamentos C+, T1 e T2 apresentaram melhores resultados para motilidade espermática total quando comparados ao T3 (TABELA 1). Entretanto, para os parâmetros de motilidade progressiva, duração da motilidade e taxa de fertilização pós-descongelamento não foram observadas diferenças entre eles (TABELA 1).

Tabela 2 - Porcentagem de anomalias observadas no sêmen descongelado de curimba.

Tratamento	Peça			Totais
	Cabeça	Intermediária	Cauda	
<i>In Natura</i>	1,5±0,6 <sup>a</sup>	0,0±0,0	24,3±1,7 <sup>a</sup>	25,8±1,3 <sup>a</sup>
C+	3,5±2,4 <sup>a</sup>	0,8±1,0	41,0±3,6 <sup>b</sup>	45,3±3,9 <sup>b</sup>
T1	4,3±1,3 <sup>a</sup>	0,3±0,5	39,5±2,1 <sup>b</sup>	44,0±2,2 <sup>b</sup>
T2	6,3±1,7 <sup>b</sup>	0,0±0,0	38,8±4,0 <sup>b</sup>	45,0±5,4 <sup>b</sup>
T3	5,3±1,5 <sup>b</sup>	0,0±0,0	41,0±1,7 <sup>b</sup>	46,3±3,1 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P<0,05). Legenda: C+: controle positivo sem melatonina; T1: tratamento com 1 mM de melatonina; T2: tratamento com 2mM de melatonina; T3:tratamento com 3mM de melatonina

O processo de criopreservação aumentou significativamente o número total de espermatozoides anômalos (TABELA 2).

Dentre as anomalias de cabeça, T2 e T3 foram os que apresentaram os maiores valores (TABELA 2), sendo que “cabeça isolada” foi a mais encontrada para todos os tratamentos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o sêmen *in natura* quando comparadas as anomalias de peça intermediária (TABELA 2).

Com relação às anomalias de cauda dos espermatozoides, embora o processo de criopreservação tenha elevado significativamente seu número (P<0,05), não foram observadas diferenças entre os tratamentos criopreservados (P>0,05) (TABELA 2). E, dentre as anomalias de cauda, “cauda dobrada” foi encontrada com maior frequência.

#### 4 DISCUSSÃO

A qualidade seminal *in natura* afeta diretamente o resultado da criopreservação e da fertilização, tornando-se imprescindível a sua avaliação antes da realização do procedimento de congelamento (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). Os valores encontrados no estudo atual para o sêmen fresco de curimba corroboram com os encontrados anteriormente para a mesma espécie, o que indica que o sêmen utilizado apresentava-se com boa qualidade e apto para ser congelado (VIVEIROS; LEAL, 2016; VIVEIROS; TAFFAREL; LEAL, 2014).

A taxa de motilidade total observada para o tratamento C+ (controle positivo) após o descongelamento nesse estudo (65%) foi mais elevada que a encontrada por Felizardo et al. (2010) (56%), sendo que utilizaram a mesma espécie (*Prochilodus lineatus*) e concentração de DMSO (8%) do presente estudo para o congelamento. Essa diferença entre os resultados pode ser devido à qualidade do sêmen *in natura* utilizado, tendo em vista que Felizardo et al. (2010) utilizaram sêmen *in natura* com até 85% de motilidade, enquanto que neste trabalho foi utilizado sêmen com no mínimo 95% de motilidade, ressaltando que a qualidade do sêmen *in natura* pode afetar os resultados obtidos após o processo de criopreservação.

Estudos têm demonstrado que a utilização de DMSO como crioprotetor promove dano oxidativo significativo após o processo de congelamento, afetando os parâmetros bioquímicos do sêmen mais seriamente que outros crioprotetores (LI et al., 2010; 2013). Visando reduzir o estresse gerado por esse composto, uma série de antioxidantes naturais e sintéticos foi identificada e tem apresentado níveis variáveis de eficiência a depender da espécie, concentração ou de sua combinação a outros compostos (LAHNSTEINER et al., 2011; OSIPOVA et al., 2014). Sendo assim, justifica-se a escolha do DMSO como crioprotetor para congelamento neste trabalho.

Nos últimos anos surgiram várias evidências da eficiência da melatonina como protetora do espermatozoide em diferentes tipos de lesões através da sua capacidade de neutralizar um grande número de radicais livres altamente tóxicos (HARDELAND; TAN; REITER, 2009; TAN et al., 2007) e influenciar a expressão gênica de diferentes enzimas antioxidantes, elevando o nível de RNA mensageiro e proteínas destas (GHAZALEH et al., 2015; REITER et al. 2000).

A adição de 1 e 2 mM de melatonina ao meio crioprotetor não diferiu-se estatisticamente nos parâmetros de motilidade do sêmen quando em comparação ao grupo controle positivo. Resultado semelhante foi observado para sêmen de cão, em que a presença de 1mM de melatonina no meio não desempenhou qualquer efeito na manutenção da motilidade espermática pós-descongelamento (VARESI et al., 2014). Vale ressaltar que nosso trabalho é pioneiro na avaliação dos efeitos da adição de melatonina ao meio crioprotetor de sêmen de peixes.

O resultado encontrado para sêmen de peixes difere do encontrado para sêmen de touros da raça Holstein (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013) e humanos (ORTIZ et al., 2011), em que a adição de melatonina ao meio de criopreservação promoveu um aumento na taxa de motilidade dos espermatozoides. Autores sugerem que esse aumento, como consequência da exposição à melatonina, é resultado da produção de ATP estimulada ao nível mitocondrial, sendo ela capaz de estabilizar esta membrana interna e melhorar assim a atividade da cadeia de transporte de elétrons (GARCÍA et al., 1999; ORTIZ et al., 2011).

De modo contrário, Tanyildizi et al. (2006) avaliaram a influência de quatro doses de melatonina (0,5, 1, 2 e 4mM) sobre a motilidade dos espermatozoides de touros da raça Holstein durante 60 minutos de incubação e concluíram que houve efeito negativo após essa adição. A melatonina endógena teria inibido o influxo de cálcio, diminuindo sua concentração intracelular e

consequentemente a motilidade do espermatozoide (SLANAR; PELISEK; VANECEK, 2000).

Alterações morfológicas na membrana plasmática durante a criopreservação levam à peroxidação da bicamada lipídica por conta da elevada produção de ERO's durante o processo de congelamento-descongelamento (SARIÖZKAN et al. 2010). Essas alterações comprometem a progressividade dos espermatozoides, promovendo movimentos circulares e oscilatórios que diminuem a taxa de fertilização (KAVAMOTO et al., 1999). Os resultados do atual estudo demonstram que a adição de diferentes doses de melatonina na solução crioprotetora não desempenhou efeitos significativos sobre o total de alterações morfológicas no sêmen descongelado quando em comparação ao grupo controle positivo. O mesmo resultado foi observado para o sêmen de cão, em que o número total de alterações morfológicas do sêmen criopreservado com 1mM de melatonina não diferiu-se do grupo controle (VARESI et al., 2014). No entanto, difere do encontrado por Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013), em que a suplementação do meio com melatonina causou diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) nas taxas de anormalidade total em comparação com o grupo controle e atingiu a menor porcentagem de espermatozoides anormais com 1 e 2mM de melatonina.

Todos os tratamentos deste trabalho apresentaram taxas de anomalias espermáticas menores que 50%. Miliorini et al. (2011) afirmam que sêmen com até 50% de anormalidade é considerado apto para ser utilizado no processo de fertilização, tendo em vista que um maior volume de sêmen deverá ser empregado nessas condições, em comparação à fertilização com sêmen *in natura*. “Cauda dobrada” foi a alteração morfológica de cauda mais frequente nos tratamentos, assim como também o foi para o sêmen *in natura*. Maiores números de “cabeça isolada” foram observados para os tratamentos T2 e T3,



porém este tipo de anomalia é considerado como anomalia secundária, advinda não do reprodutor, mas do manejo incorreto do sêmen (MILIORINI et al., 2011).

Embora a taxa e duração da motilidade sejam parâmetros essenciais para verificação da qualidade do sêmen após o descongelamento, a porcentagem de fertilização é quem irá confirmar a efetividade dos tratamentos, e, neste experimento, foi possível observar que a adição de melatonina, independente da dose utilizada, aumentou em aproximadamente 100% a porcentagem de fertilização em relação ao grupo C+, apesar de não terem diferido estatisticamente. Do ponto de vista biológico, este componente pode ter atuado melhorando a eficiência da fertilização do sêmen pós-congelamento. De acordo com Vaz, Torquato e Barbosa (2000), taxas de fertilização acima de 30% são consideradas boas, tendo em vista que na natureza este valor é cerca de 1%.

O tratamento contendo 3mM de melatonina apresentou resultados inferiores aos demais na motilidade total ( $P < 0,05$ ), porém, não diferiu-se quanto a sua duração, ao total de espermatozoides em movimento progressivo, número de anomalias morfológicas e, quanto à capacidade de fertilização, indicando que, possivelmente, o número de espermatozoides em movimento total era menor, mas a movimentação foi eficiente na busca pelo ovócito.

Resultados semelhantes foram observados por Casao et al. (2010), ao incubarem sêmen de carneiros a 39°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os autores relataram que, embora não tenha alterado os parâmetros de viabilidade do sêmen após algumas horas de incubação, a presença de 100pm de melatonina induziu a capacitação dos espermatozoides, o que resultou no aumento da fertilização do oócito e das taxas de clivagem. O efeito encontrado corrobora com o observado para hamsters, em que a adição de melatonina aumentou a hiperativação dos espermatozoides desses animais, com a dose de 1nM sendo a mais eficaz (FUJINOKI, 2008).

Tem sido demonstrado que a melatonina exerce efeitos protetores de forma dose-dependente (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; CASAO et al., 2010; FUJINOK, 2008; PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013; SUCCU et al., 2011). Succu et al. (2011) ao adicionarem doses de 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10mM de melatonina ao meio crioprotetor de sêmen de carneiros perceberam que somente a dose de 1mM pareceu proporcionar a melhor proteção aos espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento e o aumento adicional na concentração de 10mM de melatonina não foi seguido por um aumento adicional nos efeitos benéficos da melatonina. Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013), por outro lado, ao testarem doses de 1, 2, 3 e 4mM de melatonina ao sêmen de touros, observaram que a dose de 4mM resultou na diminuição da motilidade total. Esse efeito também foi observado no presente estudo, visto que a solução contendo 3mM de melatonina apresentou valores inferiores de motilidade total ( $P<0,05$ ).

A quantidade excessiva de antioxidante pode tornar-se tóxica, pois provoca excesso de fluidez da membrana do espermatozoide e alterações do seu estado fisiológico normal, além de reduzir ERO's a níveis extremos e impedir que ela exerça algumas funções essenciais ao espermatozoide (PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013; ROCA et al., 2004; SHOAE; ZAMIRI, 2008). Adicionalmente, sabe-se que elevados níveis de melatonina podem, ainda, prejudicar o desenvolvimento ou a maturação dos espermatozoides, reduzindo o seu potencial fecundante (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

No presente estudo, a adição de melatonina à solução crioprotetora de sêmen de curimba promoveu uma viabilidade espermática semelhante estatisticamente ao controle positivo, quando considerados os parâmetros de porcentagem e duração da motilidade, alterações morfológicas totais e taxa de fertilização.

## **5 CONCLUSÃO**

Nas condições em que o experimento foi realizado, a adição de melatonina à solução crioprotetora de sêmen de curimba não foi capaz de promover maior viabilidade espermática.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007, p. 501.
- ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 139, n. 1/4, p. 25-30, June 2013.
- BARLETTA, M. et al. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 76, n. 9, p. 2118-2176, June 2010.
- CASAO, A. et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal Of Pineal Research**, Oxford, vol. 48, n. 1, p. 39-46, Jan. 2010.
- CABRITA, E. et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 1/4, p. 189-195, May 2011.
- FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p.259-263, Dec. 2010.
- FUJINOKI, M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, Cambridge, v. 136, n. 5, p. 533–541, Nov. 2008.
- GARCÍA, J. J. et al. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 31, n. 6, p. 609-616, Dec. 1999.
- GHAZALEH, I. et al. Melatonin Has a Beneficial Effect on Stallion Sperm Quality in Cool Condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Champaign, v. 35, n. 7, p. 555–559, July 2015.
- HARDELAND, R.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. **Journal Of Pineal Research**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 109-126, Sept. 2009.

JANG, H. Y., et al. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, New York, v. 45, n. 6, p. 943-950, Dec. 2010.

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Eds.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 347-397.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; KUNZ, F.A. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 76, n. 5, p. 882–890, Sep. 2011.

LI, P. et al. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm induces protein phosphorylation in tyrosine and threonine residues. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 80, n. 2, p. 84–89, Jul. 2013.

\_\_\_\_\_. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 3, p. 413–423, Aug. 2010.

MARIA, A.N. et al. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, v. 20, n.1, p. 39–43, Feb. 2012.

MILIORINI, A. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 177-187, Nov. 2011.

ORTIZ, A. et al. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm

motility. **Journal Of Pineal Research**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 132-139, Mar. 2011.

OSIPOVA, V. P. et al. Cryoprotective effect of phosphorous-containing phenolic anti-oxidant for the cryopreservation of beluga sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 69, n. 3, p. 467–472, Dec. 2014.

PANG, Y. W. et al. Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. **Molecular Reproduction & Development**, New York, v. 83, n. 11, p. 993-1002, Nov. 2016.

PAULINO, M. S. P. **Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): Técnicas para o descongelamento**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.). **Cryopreservation and Freeze-drying Protocols**, Totowa: Humana Press, 2007. p. 39-57.

PERUMAL, P.; VUPRU, K.; KHATE, K. Effect of Addition of Melatonin on the Liquid Storage (5°C) of Mithun (*Bos frontalis*) Semen. **International Journal Of Zoology**, Cairo, v. 2013, p. 1-10, Nov. 2013.

REITER R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. **Journal of Biomedical Science**, Oxford, v. 7, p. 444-458, June 2000.

ROCA, J. et al. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 397–405, May/June 2004.

SAPANIDOU, V. et al. 2015. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 84, n. 8, p. 1273–1282, Nov. 2015.

SARIÖZKAN, S. et al. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 73, n. 3, p. 316-323, Feb. 2010.

SHOAE, A.; ZAMIRI, M. J. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104 n. 2/4, p. 414-418, Mar. 2008.

SLANAR, O.; PELISEK, V.; VANECEK, J. Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and  $[Ca^{2+}]$  in cultured cells of neonatal rat pituitary. **Neurochemistry International**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 213-219, March 2000.

STREIT-JR., D. P. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v.7, n. 2, p. 157-162, Jul./Dez. 2004.

SUCCU, S. et al. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal Of Pineal Research**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 310-318, Apr. 2011.

SUQUET, M. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 3, p. 231-243, Mar. 2000.

TAN, D. X. et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal Of Pineal Research**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 28-42, Jan. 2007.

TANYILDIZI, S. et al. In Vitro effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, Kirikkale**, v. 30, n. 1, p. 89-93, Jan. 2006.

VARESI, S. et al. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. **Reproductive Biology**, New York, v. 14, n. 4, p. 257-261, Dec. 2014.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M.C. Sperm dilution ratio affects post-thaw motility rate and velocity of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Zygote**, Cambridge, v. 24, n. 5, p 662-667, Oct. 2016.

VIVEIROS, A. T. M.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus*

(Characiformes: Prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 12, n. 3, p. 643-648, July/Sept. 2014.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 1/2, p. 293-300, June 2009.