



PRISCILA COTTA PALHARES

**MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE *Brycon orbignyanus*
(Valenciennes, 1850)**

**LAVRAS - MG
2019**

PRISCILA COTTA PALHARES

**MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DE *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Genética, Reprodução e Sanidade de Animais Aquáticos, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador
Dr. Luis David Solis Murgas

**LAVRAS - MG
2018**

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

Palhares, Priscila Cotta.

Melatonina como antioxidante na criopreservação de sêmen de
Bryconorbignyanus (Valenciennes, 1850) / Priscila Cotta Palhares.
- 2018.

92 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. Piracanjuba. 2. Congelamento. 3. Estresse oxidativo. I.
Murgas, Luis David Solis. II. Título.

PRISCILA COTTA PALHARES

**MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DE *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850)**

**MELATONIN AS ANTIOXIDANT IN THE CRIOPRESERVATION OF SEMEN OF
Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1850)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Genética, Reprodução e Sanidade de Animais Aquáticos, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 17 de dezembro de 2018.

Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA
Dra. Gilmara Junqueira Machado	UFLA
Dra. Mariana Martins Drumond	CEFET - MG
Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado	UFG

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

*À presença Divina em meu coração, por me guiar e ser meu porto seguro,
principalmente nos momentos de angústia e dificuldades.*

*Ao meu pai, Marcelo, por todo carinho, apoio e incentivo para a realização deste
trabalho.*

*À minha amadíssima mãezinha que, mesmo não estando presente fisicamente, foi um
dos meus maiores incentivos para esta conquista.*

*Aos meus irmãos, Bruno, Matheus e Mariana por serem tão presentes nessa jornada,
me ofertando muito amor e carinho sempre.*

À minha família e amigos queridos, pelo apoio e presença constantes.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À força divina que foi a minha base durante toda essa jornada, me permitindo força e persistência.

Ao meu pai, Marcelo de Oliveira Palhares, pelo incentivo e apoio constante e por ser um ótimo ouvinte, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Bruno, Matheus e Mariana, pelo apoio e amor incondicional.

A Mariza, pelo cuidado e atenção constante, pelos ouvidos emprestados para os desabafos e, enfim, por ser esse ser incrível que Deus colocou na minha vida.

Ao IFET Sudeste MG, *campus* Rio Pomba, e aos colegas do Departamento de Zootecnia, pela confiança no meu trabalho e apoio na realização de mais essa etapa da minha formação acadêmica.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, por oferecer todo o suporte necessário.

Ao professor Dr. Luis David Solis Murgas, pela orientação e por confiar no meu trabalho, acreditando sempre nas minhas ideias e incentivando e apoiando o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Alexandre Nizio Maria, à Embrapa Tabuleiros Costeiros e toda a equipe do laboratório de reprodução, por me abrirem as portas e me oferecerem, com tanto profissionalismo, um treinamento que foi crucial no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Carminda Sandra Salmito-Vanderley e a toda a sua equipe por me receberem tão bem na UECE e por compartilharem seus conhecimentos na criopreservação de sêmen de peixes. Foi realmente muito importante na minha caminhada até aqui.

Ao professor Dr. José Camisão de Souza, pela atenção e empréstimo da máquina de congelamento.

À professora Dra. Mariella Freitas e toda a sua equipe, em especial a Renata, por todo o apoio nas análises de estresse oxidativo.

À Estação Ambiental de Volta Grande (EAVG) e à Dra Alessandra Bedore, por nos disponibilizarem toda a estrutura e animais, e por nos auxiliarem, sempre com muita atenção e disponibilidade, durante o período de coleta de material.

À Estação Ambiental de Itutinga (EAITU), em especial ao Sr. Jaílson, pelo carinho e atenção com que nos recebeu e nos ajudou durante os cansativos períodos de coleta, por nos disponibilizar toda a infraestrutura do local e os animais, e pela transmissão de ensinamentos, com tanto amor e cuidado com os animais.

Aos funcionários Joelson, Sr. Willian e Sr. Francisco, por toda a ajuda, sempre com muita boa vontade, pela amizade e pelos bons momentos de convivência.

Aos professores e amigos queridos, Dr. Eduardo Mendes Ramos e Dra. Alcinéia Lemos Ramos, do Departamento de Engenharia de Alimentos, da UFLA pela amizade e por toda a ajuda, sempre que solicitada, durante a execução deste projeto.

À querida amiga e médica veterinária, Erika, por todo apoio incondicional durante o desenvolvimento deste trabalho. Você foi um presente de Deus na minha vida.

Às amigas Maysa, Mirella, Renata Francisco, Jaqueline e Marina, pelos ouvidos e apoio nas horas difíceis, pelas boas conversas e pela cumplicidade sempre.

Ao amigo Fidelis, pela amizade e por estar sempre pronto a ajudar, independentemente das circunstâncias.

Ao casal que mais amo nesse mundo, Geisa e Rafa, por todo apoio e cuidado comigo, principalmente na pré-defesa. Vocês são sensacionais!

Aos colegas do Biotério Central, em especial a Isadora Assis, Gilmara, Willian, Gilmar, Naiara Mota, Thales França, Renata e Daniela, por todo o apoio durante as coletas, análises e demais atividades decorrentes deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação e para a execução deste projeto.

MUITO OBRIGADA!!

RESUMO GERAL

Objetivou-se o aperfeiçoamento do protocolo de congelamento de sêmen para piracanjuba, utilizando diferentes curvas de congelamento e soluções contendo melatonina. Este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na avaliação do sêmen criopreservado em soluções contendo diferentes concentrações de melatonina e em diferentes tempos de permanência, em botijão de vapor de nitrogênio. A segunda etapa avaliou o sêmen diluído nas mesmas concentrações de melatonina das soluções da primeira etapa, no entanto, as mesmas foram criocongeladas em duas curvas diferentes: uma utilizando-se *dry shipper* e outra utilizando uma máquina de congelamento. As coletas de sêmen foram realizadas nas Estações de Piscicultura da Cemig, em Volta Grande e em Itutinga, nos períodos de piracema, em 2016-2017 e 2017-2018. O sêmen foi caracterizado por meio da observação de volume, aspecto, coloração, vigor e concentração espermática. Os parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade das células espermáticas foram a taxa e a duração da motilidade, a integridade de membrana plasmática, a morfologia, perfil oxidativo e as taxas de fertilização e eclosão. As variáveis do perfil oxidativo foram avaliadas utilizando o programa Graph pad prism 6.0 e as demais variáveis do experimento foram analisadas com o auxílio do programa estatístico R. Para testar a normalidade foi realizado o teste de Shapiro-Wilks, em seguida efetuou-se a análise de variância (*one-way* ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey quando constatado efeito significativo ($p < 0,05$). Na primeira etapa, somente para a taxa de fertilização foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na interação entre as soluções e os tempos no *dry shipper*. A solução M2 apresentou os melhores resultados em relação à solução controle, para os parâmetros de vitalidade, taxa de motilidade, tempos de motilidade e motilidade progressiva ($85,2 \pm 2,8\%$, $64,63 \pm 8,3\%$, $84,22 \pm 11,4$ seg, $17,01 \pm 1,2\%$). Na segunda etapa, observou-se diferença ($p < 0,05$) entre as soluções nos parâmetros de vitalidade, morfologia, motilidade e taxa de fertilização. As soluções com melatonina apresentaram os melhores valores. No estresse oxidativo, apenas a peroxidação lipídica e a atividade de SOD apresentaram diferença ($p < 0,05$) na interação curva e solução, mostrando as soluções com melatonina com os menores valores. Conclui-se que a adição de melatonina na concentração de 2 mM, associada ao crioprotetor metilglicol na solução de criocongelamento, melhorou a qualidade espermática, independentemente das curvas utilizadas.

Palavras-chave: Piracanjuba. Congelamento. Estresse oxidativo. Oxidação. Curvas.

GENERAL ABSTRACT

The objective was to improve the semen freezing protocol for piracanjuba, using different freezing curves and melatonin-containing solutions. This study was divided into two stages. The first, consisted of the evaluation of cryopreserved semen in solutions containing different concentrations of melatonin and at different residence times in a nitrogen vapor canister. The second evaluated the semen diluted at the same melatonin concentrations as the first stage solutions, however, they were frozen in two different curves: one using a *dry shipper* and another using a freezing machine. Semen collections were carried out at Cemig Fish Farming Stations in Volta Grande and Itutinga during the piracema periods in 2016-2017 and 2017-2018. Semen was characterized by observation of volume, appearance, coloration, vigor and sperm concentration. The parameters used to evaluate sperm cell quality were motility rate and duration, plasma membrane integrity, morphology, oxidative profile and fertilization and hatching rates. The oxidative profile variables were evaluated using the Graph pad prism 6.0 program and the other variables of the experiment were analyzed with the aid of the R statistical program. of variance (*one-way* ANOVA). Means were compared by Tukey test when significant effect was found ($p < 0.05$). In the first stage, only for the fertilization rate was observed statistically significant difference ($p < 0.05$) in the interaction between the solutions and the times in the *dry shipper*. The M2 solution presented the best results in relation to the control solution, for the parameters of vitality, motility rate, motility times and progressive motility ($85.2 \pm 2.8\%$, $64.63 \pm 8.3\%$, $84, 22 \pm 11.4$ sec, $17.01 \pm 1.2\%$). In the second stage, a difference ($p < 0.05$) was observed between the solutions in the parameters of vitality, morphology, motility and fertilization rates. Melatonin solutions presented the best values. In oxidative stress, only lipid peroxidation and SOD activity showed differences ($p < 0.05$) in the curve and solution interaction, showing the solutions with the lowest values. It was concluded that the addition of melatonin at a concentration of 2 mM, associated with the cryoprotectant methylglycol in the freezing solution, improved the sperm quality, regardless of the curves used.

Keywords: Piracanjuba. Freezing. Oxidative stress. Oxidation. Curves.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850). 14
- Figura 2 - Reagentes e enzimas antioxidantes que sofrem ação da melatonina. Em vermelho, reagentes à base de oxigênio. Em azul, reagentes à base de nitrogênio. *: reagentes eliminados diretamente pela melatonina; (↑): enzimas antioxidantes estimuladas pela melatonina; (↓) enzimas pró-oxidativas inibidas pela melatonina. GSH: glutation; GSR: glutathionaredutase; GPX: glutathionaperoxidase; SOD: superóxido desmutase; CAT: catalase; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; MPO: mieloperoxidase; GCL: glutamilsteínaaligase; O₂: oxigênio molecular; O₂·-: radical superóxido; ONOO·-: peroxinitrito; OH·: radical hidroxila; GSSG: glutathiona oxidada; H₂O₂: peróxido de hidrogênio..... 26

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 2

- Figura 1 - Peroxidação lipídica (MDA), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyanus* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística p<0,001. n=16. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2). 79
- Figura 2 - Atividade de superóxido dismutase (SOD), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyanus* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística p<0,001. n=16. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2). 80
- Figura 3 - Atividade da catalase (CAT), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyanus* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística p<0,001. n=16. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2). 80
- Figura 4 - Quantificação de óxido nítrico (ON), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyanus* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística p<0,001. n=16. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2) 81

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1 - Características do sêmen <i>in natura</i> de piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>).....	52
Tabela 2 - Resultados médios da vitalidade espermática (%) no sêmen fresco e descongelado de <i>B. orbignyanus</i>	53
Tabela 3 - Médias e desvio padrão do tempo de motilidade (TM – segundos), motilidade total (MT - %) e motilidade progressiva (MP - %) do sêmen de piracanjuba descongelado.	54
Tabela 4 - Médias e desvio padrão da porcentagem de alterações encontradas no sêmen <i>in natura</i> e descongelado de <i>B. orbignyanus</i>	55
Tabela 5 - Porcentagem média das fertilizações em todos os tratamentos para o sêmen de piracanjuba.	56

ARTIGO 2

Tabela 1 - Resultados médios da vitalidade espermática (%), interação entre as soluções e curvas no sêmen descongelado de <i>B. orbignyanus</i>	76
Tabela 2 - Resultados médios da vitalidade espermática (%) no sêmen fresco e descongelado de <i>B. orbignyanus</i>	77
Tabela 3 - Médias e desvio padrão do tempo de motilidade (TM – segundos), motilidade total (MT - %) e motilidade progressiva (MP - %), do sêmen de piracanjuba descongelado.	77
Tabela 4 - Médias e desvio padrão da porcentagem de alterações espermáticas encontradas no sêmen <i>in natura</i> e descongelado de <i>B. orbignyanus</i>	78
Tabela 5 - Médias e desvio padrão das taxas de fertilização e eclosão das amostras de sêmen de piracanjuba <i>in natura</i> e descongeladas.....	81
Tabela 6 - Resultados das taxas de fertilização e eclosão na interação solução e curvas de congelamento no sêmen descongelado de <i>B. orbignyanus</i>	82

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
	INTRODUÇÃO GERAL	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Piracanjuba	14
2.2	Características do sêmen de peixes	15
2.3	Criopreservação de sêmen de peixes e suas consequências	19
2.4	Soluções crioprotetoras	20
2.4.1	Diluidores	20
2.4.2	Crioprotetores	21
2.5	Descongelamento do sêmen de peixes	22
2.6	Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen	23
2.7	Adição de antioxidantes na solução crioprotetora	25
2.7.1	Melatonina	25
2.8	Avaliação da qualidade do sêmen	27
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE	41
	ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DE PIRACANJUBA SUBMETIDO AO CONGELAMENTO UTILIZANDO SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA	41
1	INTRODUÇÃO	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DE PIRACANJUBA SUBMETIDO A DUAS CURVAS DE CONGELAMENTO EM SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA	62
1	INTRODUÇÃO	66
2	MATERIAL E MÉTODOS	68
3	RESULTADOS	76
4	DISCUSSÃO	83
5	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie de peixe de porte médio que realiza migrações tróficas e reprodutivas, sendo também muito sensível a alterações ambientais (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007). Ela é nativa da bacia dos rios Uruguai e Paraná, e está, atualmente, classificada como em perigo de extinção, pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, devido a diversos fatores, como construção de barragens, pesca predatória, fragmentação ambiental, desmatamento, poluição e introdução de espécies exóticas (BRASIL, 2008). Visando à preservação desta espécie, a sua inclusão em programas de conservação *ex situ* parece ser uma boa estratégia para a manutenção de seu material genético (POMPELLI; GUERRA, 2004).

A criopreservação de sêmen é uma excelente ferramenta na aquicultura, para a preservação de material genético, que pode ser utilizada em programas de repovoamento ou de melhoramento genético de espécies de interesse econômico, além de permitir o armazenamento desse material por longos períodos (NAVARRO et al., 2014; ZANIBONI-FILHO; BALDISSEROTO, 2015). Trata-se de uma técnica capaz de congelar o sêmen utilizando nitrogênio líquido.

O desenvolvimento das técnicas de congelamento já é bem estabelecido para a maioria das espécies de produção, entretanto, em peixes, estudos continuam sendo desenvolvidos, visando buscar melhores protocolos para esta espécie. Os protocolos podem sofrer diversas variações devido à alta diversidade de características do sêmen dos peixes. No entanto, esta biotecnologia, apesar de ser muito promissora, apresenta alguns efeitos indesejáveis, como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode reduzir a qualidade espermática com consequente dano ao DNA após o descongelamento, em virtude de danos causados na célula (BALL, 2008; PÉREZ-CEREZALES et al., 2010).

Uma forma de minimizar esses efeitos é a suplementação com substâncias capazes de aumentar o potencial antioxidante da solução de criocongelamento, proporcionando um meio mais eficaz e adequado para a sobrevivência da célula espermática durante o processo de criocongelamento e mantendo a qualidade espermática após o descongelamento (LOPES; SALMITO-VANDERLEY; ALMEIDA-MONTEIRO, 2016).

Substâncias antioxidantes têm sido testadas em meios de criocongelamento, visando alcançar essa melhor qualidade seminal (CABRITA et al., 2011; LAHNSTEINER; MANSOUR; KUNZ, 2011; LINHARES et al., 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2013; NAVARRO et al., 2014). A melatonina tem apresentado excelentes resultados no criocongelamento de sêmen de humanos, bovinos, bubalinos, carneiros e cavalos (GHAZALEH et al., 2015; LI et al., 2012; PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013). No entanto, em piracanjuba, até o momento, não foram encontrados trabalhos nos quais tivesse sido utilizada esta substância.

Objetivou-se neste trabalho, o aperfeiçoamento do protocolo de congelamento de sêmen para Piracanjuba, através da utilização de diferentes curvas de congelamento, bem como o uso de soluções de congelamento contendo melatonina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Piracanjuba

O *Brycon orbignyanus*, popularmente conhecido como piracanjuba, é um peixe da ordem dos Characiformes e família Bryconidae. É considerado um indicador de qualidade, devido à sua sensibilidade às mudanças na dinâmica das águas (ESCHMEYER; FONG, 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Esta espécie encontra-se distribuída ao longo da bacia do rio da Prata, e da dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai (LIMA, 2003), onde, por muitos anos, figurou entre as espécies com maior importância comercial em registros de pesca (CAROLSFELD et al., 2003).

O seu corpo é alongado e fusiforme, com a boca terminal e ampla. A coloração de seu corpo é prateada e o dorso castanho-escuro com uma mancha negra na base do pedúnculo caudal, que se estende até os raios caudais medianos. As nadadeiras são de cor avermelhada e a nadadeira caudal apresenta uma faixa mediana escura (BRITO; BAZZOLI, 2003; VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

É uma espécie onívora que se alimenta de plantas, pequenos peixes e insetos, em ambientes naturais. Tem afinidade com ambientes de águas claras e sombreados, principalmente em locais onde as árvores se deitam sobre o rio, o que facilita a obtenção de frutos que lhe servem de alimento (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000; ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003).

Apresenta bom potencial zootécnico, do ponto de vista do cultivo, como rápido crescimento e ganho de peso, demonstrado em criações experimentais, e carne de excelente qualidade (FREATO, 2005). É uma espécie considerada de médio a grande porte, podendo atingir 70 cm de comprimento. Apresenta comportamento arisco e agressivo, o que faz com que seja muito apreciada pelos praticantes da pesca esportiva (LIMA, 2003).

Figura 1 - Piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850).



Fonte: Oliveira et al. (2017).

Esta espécie se encontra classificada como em perigo de extinção, pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, devido a fatores diversos que têm ocasionado o seu desaparecimento, como a destruição das matas ciliares, a construção de barragens, a pesca predatória, a fragmentação ambiental, o desmatamento, a poluição e a introdução de espécies exóticas (BRASIL, 2008; VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

A construção de usinas hidrelétricas nos rios onde habita tem sido um dos principais fatores prejudiciais à reprodução da piracanjuba. Essa espécie nativa é um peixe reofílico (de piracema) que realiza migração reprodutiva subindo o rio, entre setembro e outubro, culminando com a desova, entre novembro e janeiro. Sendo assim, as barragens constituem barreira intransponível na sua rota migratória, reduzindo ou eliminando sua eficiência reprodutiva e o retorno dos alevinos (VIVEIROS et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2017). Para amenizar essa situação, a inclusão dessa espécie em programas de conservação *ex situ*, como o seu uso em programas para o repovoamento de reservatórios hidrelétricos, se torna uma boa estratégia para a conservação de seu material genético (POMPELLI; GUERRA, 2004; SILVA, 2007).

Além disso, essa é uma espécie de grande interesse pela produção em cativeiro para pisciculturas comerciais. No entanto, ela não se reproduz naturalmente em cativeiro (MOREIRA et al., 2001; SILVA, 2007). Uma forma de aperfeiçoar essa reprodução é pelo uso de biotecnologias que permitam a manutenção da variabilidade genética, além de disponibilizar um material genético de qualidade para a sua produção. A criopreservação de gametas é uma estratégia capaz de atender a estes pré-requisitos, no entanto, os protocolos vêm sendo estudados visando ao aperfeiçoamento das técnicas para melhor conservação da qualidade desses gametas no pós-congelamento (LOPERA-BARRERO, 2007; OLIVEIRA et al., 2017).

Diante de tudo isso, essa espécie se torna um ótimo modelo experimental para pesquisas na área reprodutiva e de preservação, sendo representada em diversos trabalhos que visam a preservação do material genéticos desses animais (GONÇALVES et al, 2013; LÓPEZ et al, 2015; OLIVEIRA et al, 2017;).

2.2 Características do sêmen de peixes

É possível observar grande variabilidade nas características seminais dos peixes, principalmente no que diz respeito à concentração, ao volume e à composição do sêmen. Isso está associado a interações complexas de fatores, como diversidade genética, envelhecimento

dos espermatozoides no testículo, sazonalidade e estratégias reprodutivas associadas às adaptações necessárias para cada espécie (CARVALHO, 2012).

O sêmen é composto por espermatozoides e um líquido, ou suspensão celular, semigelatinoso, denominado de plasma seminal (GARNER; HAFEZ, 2004). Este fluido produzido pelos testículos e ducto espermático apresenta diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídeos, açúcares e ácidos. Ele é responsável por fornecer proteção e viabilidade à célula espermática, regulando a osmolaridade, a manutenção da imobilidade dos espermatozoides no trato genital e, principalmente, a proteção desses espermatozoides contra danos oxidativos e proteolíticos (CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2000; HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). Quando comparado com o de vertebrados superiores, o plasma seminal de peixes é caracterizado por baixa concentração de proteínas e outros compostos orgânicos, sendo constituído, principalmente, por compostos minerais, como sódio, potássio, cálcio e magnésio. Também é possível encontrar glicose e frutose, bem como alguns antioxidantes, como o ácido ascórbico e o ácido úrico. Estes últimos são responsáveis por proteger a membrana plasmática e, conseqüentemente, o DNA de danos oxidativos (METWALLY; FOUAD, 2009; SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ et al., 2013).

Os espermatozoides são capazes de gerar radicais livres por processos fisiológicos normais, através de reações de óxido-redução. Concentrações ideais de espécies reativas ao oxigênio (ERO) (peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilas (OH)) e igualmente de espécies reativas ao nitrogênio (ERN) (óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO-)) desempenham papéis críticos na hiperativação e na capacitação do espermatozoide, além de promover interação entre a célula espermática e possibilitar a fertilização, devido a manutenção das estruturas motoras da célula espermática (BAKER; AITKEN, 2004; LAMIRANDE et al., 1997).

Na tentativa de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo e manter a viabilidade celular, existem sistemas de defesa no sêmen, compostos por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como as vitaminas A/E (BIRBEN et al., 2012). Em estudos envolvendo a caracterização do sêmen de truta-marrom (*Salmo trutta*), lota (*Lota lota*), perca (*Perch flavitus*) e alburno (*Alburnus alburnos*) foi revelado certo padrão na presença de enzimas antioxidantes nas espécies citadas, apresentando o sistema formado por catalase (CAT), glutathiona redutase, peroxidase e superóxido desmutase (SOD), além de metabólitos antioxidantes, como ácido ascórbico, glutathiona, metionina e ácido úrico (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010). No entanto, os mesmos não são suficientes

para evitar os danos oxidativo causados durante o congelamento do sêmen, sendo necessário pesquisas relacionadas a adição de antioxidantes nos meios de criocongelamento.

Em se tratando da morfologia espermática, o espermatozoide de peixes teleósteos divide-se, basicamente, em cabeça, peça intermediária e cauda. Na cabeça se encontra o núcleo contendo o DNA paterno e é, na maioria das espécies, destituída de acrossoma. A ausência de acrossoma difere os peixes de vertebrados superiores, mas compensa-se pela presença da micrúpila, um orifício no ovócito das fêmeas que permite a penetração da célula espermática para realizar a fecundação (COSSON, 2010).

A peça intermediária é pequena e composta de mitocôndrias, cuja função é gerar energia para o batimento flagelar, e a cauda, ou flagelo, é responsável pela movimentação do espermatozoide (BORELLA et al., 2014; LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

Diante disso, é importante salientar que na hora de criopreservar o sêmen dessa espécie, deve-se preocupar com a escolha adequada dos crioprotetores, visando a manutenção da viabilidade da célula espermática através da preservação de suas estruturas morfológicas. Como consequência, outro parâmetro importante é preservado, a motilidade.

A motilidade dos espermatozoides de peixes teleósteos difere da das demais espécies animais, principalmente porque estas células permanecem imóveis nos testículos e no trato genital dos peixes. Isso ocorre devido à osmolaridade isotônica e à composição do plasma seminal. Essa imobilidade termina quando a célula espermática entra em contato com água salobra ou doce (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004; YANG; TIERSCH, 2009). O sêmen *in natura* de Piracanjuba é em média $94 \pm 5,48\%$ (Murgas et al, 2004).

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 produção de energia pelas mitocôndrias para o batimento flagelar e movimentação do espermatozoide (CIERESZKO; GLOGOWSKI; DABROWSKI, 2000; COSSON, 2010). 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 indutor da ativação da via de segundos mensageiros, que são indispensáveis para a transdução do sinal interno (ZILLI et al., 2011).

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). Os eventos desencadeados após a exposição espermática ao estresse osmótico são os seguintes: o sêmen transferido para a água doce; a osmolaridade externa diminui; há influxo de água devido à osmorregulação; a osmolaridade interna diminui; a concentração iônica diminui; a enzima ATPase é ativada; o estoque de trifosfato de adenosina (ATP) é reduzido; a concentração iônica interna é muito baixa para a atividade da ATPase e cessa a motilidade. Dessa forma, é possível verificar que a síntese do ATP se relaciona com a enzima ATPase, sendo esta última dependente da osmolalidade do meio intracelular. O ATP é a principal molécula energética e deriva, provavelmente, da glicólise e da 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 de 50% a 80% dos ATPs são consumidos (BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005; INGERMANN, 2008).

O tempo de movimentação das células espermáticas de peixes de água doce é curto, durando, em média, de 1 a 2 minutos, porém, extremamente variável entre as espécies. Para o sêmen de piracanjuba, Murgas et al. (2004) observaram tempos de motilidade que variaram entre 36 a 113 segundos.

Outra importante característica do sêmen, utilizada como um dos parâmetros de avaliação da qualidade seminal de peixes, é a concentração espermática. Ela é importante porque expressa a quantidade de células espermáticas por volume de sêmen e pode ser determinada por meio de métodos como a contagem utilizando câmaras hematimétricas, como a de Neubauer ou de Makler, ou, por espectrofotometria ou, ainda, por espermátocrito (CABRITA et al., 2010; CRUZ, 2001; FELIZARDO et al., 2010; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

O cálculo da concentração é expresso em número de células espermáticas por ml, pois permite a complementação pelo volume total de sêmen. A concentração do sêmen permite que ele seja otimizado em processos de desova induzida de peixes frequentemente utilizados em laboratórios de reprodução, evitando-se a proporção inadequada de espermatozoide e ovócito (CARVALHO, 2012).

Um sêmen com alta concentração nem sempre se relaciona com taxas de motilidade e fertilização elevadas, ou seja, o valor da concentração espermática não é uma medida específica da capacidade fertilizante, visto que apresenta variações que podem ser resultantes de

diferenças entre espécies, peso e 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. Em piracanjuba, por exemplo, Murgas et al. (2004) observaram concentração espermática de $8,21 \pm 2,26$ espermatozoides $\times 10^9/\text{mL}$ de sêmen. Em contrapartida, para esta mesma espécie, Bedore (1999) encontrou valores um pouco superiores, de $10,0 \pm 4,30 \times 10^9$ células espermáticas (sptz) por mililitro.

2.3 Criopreservação de sêmen de peixe e suas consequências

A criopreservação é uma técnica que envolve procedimentos que permitem o congelamento e o armazenamento de material biológico em nitrogênio na forma de vapor ou líquido, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (MINS et al., 2000). Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na conservação do sêmen de diversas espécies de peixes, incluindo as nativas do Brasil, no entanto, devido à diversidade entre essas espécies, os protocolos de congelamento devem ser constantemente adaptados (CARVALHO, 2012; FELIZARDO et al., 2010; 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, as estruturas e a funcionalidade do espermatozoide são mantidas viáveis e reversivelmente inativas metabolicamente (MARTIN-HIDALGO et al., 2011; PEGG, 2007). Essa característica torna o método seguro na preservação de recursos genéticos, em face do alto risco de extinção de algumas espécies, como a piracanjuba, devido, principalmente, a ações antrópicas prejudiciais ao ambiente (BRASIL, 2008; MURGAS et al., 2004).

No entanto, estudos têm demonstrado que o sêmen de peixes de água doce criopreservado exibe qualidade inferior ao sêmen *in natura*, apresentando de 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 et al., 2007; NUNES et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016).

Os procedimentos de congelamento e descongelamento do sêmen podem ocasionar danos nas células, em função da mudança brusca na temperatura, da formação de cristais de gelo, de injúrias oxidativas, de alterações na membrana do espermatozoide, de lesões no DNA, pelo estresse osmótico, além da toxicidade de alguns crioprotetores (BALL; VO, 2001).

Uma importante etapa do congelamento de sêmen é a remoção de água das células antes de se proceder à sua congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão no meio intracelular, danificando as estruturas do espermatozoide de forma irreversível (CELEGHINI et al., 2004).

Em contrapartida, um efeito de solução exagerado também é prejudicial, pois a remoção excessiva de água das células, proveniente de um aumento na concentração de soluto extracelular pela formação de cristais de gelo, levará à desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, à morte celular. Dessa forma, enquanto o congelamento lento evita a formação de grandes cristais de gelo intracelular, ele leva a um aumento dos danos por efeitos de solução. Portanto, a taxa ótima de congelamento para um dado tecido depende de sua tolerância relativa ao dano causado pelos cristais de gelo e da toxicidade dos efeitos de solução (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.4 Soluções crioprotetoras

As soluções crioprotetoras são constituídas, normalmente, por um diluidor, um crioprotetor extracelular e um crioprotetor intracelular. No entanto, o conhecimento sobre a composição e as funcionalidades desses componentes, bem como a escolha de um protocolo de congelamento adequado, é responsável pelo sucesso na manutenção da sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de criopreservação (GUIMARÃES et al., 2018).

2.4.1 Diluidores

A incorporação de soluções diluidoras no congelamento do sêmen é fundamental para proporcionar um meio osmótico e nutricional adequado aos espermatozoides, durante a aplicação dessa biotecnologia. Eles aumentam o volume total do sêmen, reduzindo a concorrência das células por oxigênio e espaço, facilitando a ação dos crioprotetores, além de permitir a divisão em doses inseminantes (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; MUCHLISIN, 2005).

Os diluidores são, basicamente, compostos por soluções de sais ou de carboidratos que têm como função manter a viabilidade das células durante o congelamento. É considerado um bom diluidor aquele que apresenta como características ser isotônico; não ativar a motilidade espermática, que geralmente é ativada quando em contato com água; ser estável ao longo do

armazenamento, estéril e também ser carreador de crioprotetores (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; MARIA et al., 2006).

Inúmeras soluções têm sido testadas como diluidoras para sêmen de peixes, entre elas soluções simples à base de glicose na concentração de 5%, atuando como substrato de energia e em função do seu alto peso molecular, contribuindo para o equilíbrio osmótico e atuando como substituto de eletrólitos (HOLT, 2000). O diluidor BTS (do inglês beltsville *Thawing solution*), também é utilizado no congelamento de sêmen de peixes characiformes. Ele apresenta osmolaridade de 318 mOsm e sua fórmula é composta de glicose, citrato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), carbonato ácido de sódio, cloreto de potássio e sulfato de gentamicina. Este diluidor apresenta baixo custo e foi inicialmente empregado em pesquisas com sêmen suíno, mas tem apresentado resultados expressivos quando aplicado em experimentos com algumas espécies de peixes (LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015; MILIORINI; MURGAS; PEREIRA, 2005; MURGAS et al., 2004).

Em estudos utilizando o BTS como meio diluidor em diferentes espécies de peixes têm sido demonstrados bons resultados no pós-descongelamento, como é o caso de López, Leal e Viveiros (2015) e Murgas et al. (2004), trabalhando com sêmen de piracanjuba e Miliorini (2006), com sêmen *in natura* de curimba.

Outros três diluidores seminais já testados são: M IIITM (Merck III) composto por glicose, citrato de sódio, EDTA, bicarbonato de sódio, e sulfato de gentamicina, de osmolaridade de 348 mOsm; o Ringer, composto de cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio hexahidratado, com 300 mOsm; e o ACP® que é a base de água de côco em pó. Todos esses diluidores supracitados já foram testados em *Brycon orbignyanus* em diversos estudos de criocongelamento do sêmen dessa espécie (MARIA et al., 2004; MURGAS et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2007, LÓPEZ et al., 2015).

2.4.2 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias adicionadas ao meio diluidor do sêmen com a função de preservar a integridade celular no processo de congelamento e descongelamento, devendo apresentar características como baixa toxicidade e alta solubilidade em água (MARIA et al., 2006). Sua classificação é dada de acordo com a interação existente entre eles e a membrana citoplasmática, assim como pelas suas propriedades físico-químicas (LEUNG, 1991), dividindo-os em intracelulares e extracelulares.

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. A adição desses crioprotetores é imprescindível para a criopreservação de células espermáticas, sendo os mais comumente utilizados em peixes: Dimetilssufóxido (DMSO); Metilglicol; Metanol; Dimetilacetamida (DMA); Propilenoglicol; Etilenoglicol; Cloreto de Potássio; Glicerol e Citrato e outros (SALMITO-VANDERLEY, 2010; LEITE, 2011; VIVEIROS et al 2011; MARTÍNEZ et al 2012; VIVEIROS et al 2012).

Já os crioprotetores extracelulares apresentam alto peso molecular e são incapazes de atravessar a membrana. Por essa razão, atuam como estabilizadores e reparadores externos da membrana celular (MARIA et al., 2006). Sendo os mais testados em peixes: a gema de ovo de galinha e o leite desnatado, pois a caseína do leite e as lipoproteínas da gema têm propriedade protetora (NAVARRO et al., 2004).

O diluidor mais testado em piracanjuba é o metilglicol podendo ser ou não associado a gema de ovo, glicose 5%, água de côco ou BTS (MARIA et al ,2004; MURGAS et al, 2004; NASCIMENTO et al, 2007).

A escolha do crioprotetor mais apropriado para a espécie de interesse deverá ser feita através de testes específicos e minuciosos, pois durante o processo de congelação e descongelação os espermatzoides são expostos a condições desfavoráveis como desidratação e formação de cristais de gelo, que podem afetar muito a sua qualidade e prejudicar a fertilização (GODINHO, 2000 CRUZ, 2001; VIVEIROS et al, 2011).

As pesquisas com criopreservação de sêmen de peixes nativos ainda estão em fase de testes, quanto à capacidade fertilizante em larga escala (MARIA et al., 2006). 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 (GONÇALVES et al., 2013; LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015).

2.5 Descongelamento do sêmen de peixes

Diferentemente do congelamento do sêmen, em que ocorre desidratação das células, no descongelamento ocorrerá reidratação celular por meio do influxo de água para o meio intracelular. 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. Atualmente, os protocolos mais eficientes em manter a qualidade dos parâmetros seminais após o descongelamento utilizam temperaturas que variam entre 30 °C e 60 °C, por 3 a 8 segundos (CARNEIRO, 2007; MARIA et al., 2006). O procedimento consiste na retirada da palheta com sêmen congelado do botijão de nitrogênio e a sua imediata imersão em banho-maria, para que ocorra um descongelamento uniforme (CRUZ, 2001).

2.6 Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen

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) e de nitrogênio (ERN) são exemplos de radicais livres. Quando presentes em concentrações adequadas, elas podem desempenhar 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).

As células espermáticas expostas a técnicas de criopreservação produzem elevadas concentrações de ERO (AGARWAL; SAID, 2005; DU-PLESSIS et al., 2008). Se essas concentrações são muito altas, essas substâncias irão se acumular na célula, tornando o espermatozoide vulnerável a danos em seus componentes celulares, como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (SOUZA et al., 2016).

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 devido à elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados nelas presentes. O processo de peroxidação irá acarretar em alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana celular, podendo alterar a sua permeabilidade e seletividade, permitindo o fluxo de íons e outras substâncias tóxicas, o que pode levar à perda de função e, em condições extremas, até à morte celular (BILODEU et al., 2002).

Elevados níveis de ERO também são responsáveis por causar danos, como diminuição da motilidade dos espermatozoides, inativação de enzimas glicolíticas e oxidação do DNA, trazendo grandes prejuízos em relação à fertilização dos ovócitos (GIL-GUZMAN et al., 2001).

Em alguns trabalhos há relatos sobre a correlação entre a alta peroxidação lipídica e a baixa motilidade, como em sêmen criopreservado de *zebra fish* (HAGEDORN et al., 2012) e de *red seabream* (*Pagrus major*) (CHEN et al., 2010). Isso ocorre devido ao fato de os espermatozoides serem susceptíveis à peroxidação lipídica por conterem altas concentrações de ácidos graxos insaturados, além de perderem grande parte do seu citoplasma durante a fase final da diferenciação, o que torna limitantes os mecanismos de reparação (BORGES et al., 2011; HAGEDORN et al., 2012).

No caso das membranas das mitocôndrias, a ação das ERO irá afetar o fornecimento de energia responsável pelo movimento flagelar, refletindo na motilidade espermática (CABRITA et al., 2014). Sendo assim, como consequência da peroxidação lipídica, a qualidade espermática é diminuída em virtude da perda da fluidez da membrana plasmática e a integridade requerida para a sua participação nos eventos de fusão de membranas na fertilização (CABRITA et al., 2014; HAGEDORN et al., 2012).

Existe um sistema de defesa antioxidante de origem enzimática que tem como função reduzir ou inibir os danos causados pelo estresse oxidativo. As enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) exercem importante papel nesse sistema (BARBOSA et al., 2010). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A SOD atua na remoção do radical superóxido (O_2^-) e o converte em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto a CAT atua convertendo o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2). O peróxido de hidrogênio pode causar sérios danos ao DNA, além de perda do potencial fertilizante da célula espermática por meio da peroxidação lipídica da membrana e perda do ATP do axonema da cauda do espermatozoide (BORGES et al., 2011).

Dentre as principais ERN incluem-se óxido nítrico (NO^-), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$). O radical óxido nítrico (NO^-) pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintetase a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP⁺ e citrulina. Este radical não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido (O_2^-), gerando peroxinitrito, que pode sofrer reações secundárias, formando agentes capazes de causar danos à célula (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

2.7 Adição de antioxidantes na solução crioprotetora

A adição de um antioxidante na solução de criocongelamento pode auxiliar na redução de ERO, prevenindo o estresse oxidativo e, como consequência, aumentar a qualidade do esperma após o processo de congelamento/descongelamento, por preservar estruturas como as mitocôndrias que são importantes na motilidade da célula espermática (BERRA; RIZZO, 2009).

Visando aumentar a tolerância espermática ao dano oxidativo após o descongelamento, podem-se adicionar à solução de criocongelamento substâncias antioxidantes. Essas substâncias apresentam a capacidade de neutralizar os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BAUMBER; BLL; GRAVANCE, 2000; MAIA et al., 2009; SOUZA et al., 2016).

2.7.1 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-17acetiltransferase (AANAT) e hidroxindol-orto-metiltransferase (HIOMT) (CIPOLLA-NETO et al., 1999; KLEIN et al., 1997). Devido às suas características anfifílicas, que a tornam 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).

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, antitumorais e anti-inflamatórias, levou os cientistas a classificarem-na como uma molécula multitarefa (COS et al., 1998; REITER; FUENTES-BROTO; TAN, 2010; TAN et al., 2003; YIE; NILES; YOUNGLAI, 1995).

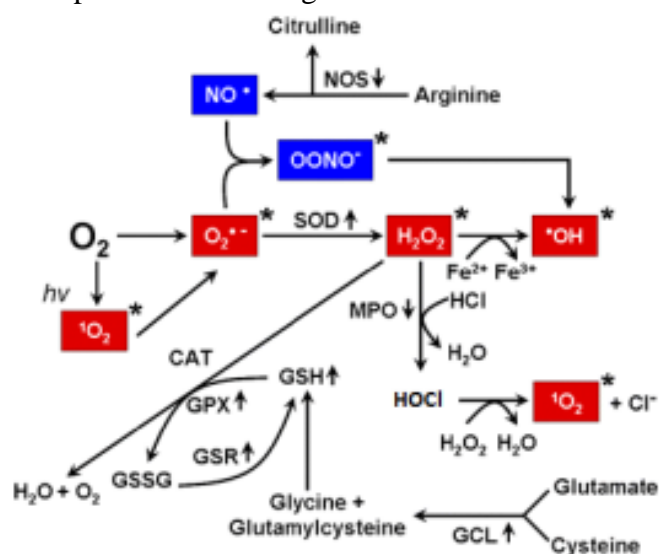
Em estudo realizado por Tan et al. (2003), utilizando um sistema *in vitro* acelular, demonstrou-se que a melatonina era capaz de sequestrar radicais livres altamente reativos, visto que ela neutralizou o radical hidroxila (OH), considerado como o radical mais reativo em

sistemas biológicos, com maior eficiência que a glutathiona reduzida (antioxidante endógeno) e o manitol (antioxidante observado em plantas).

Desde então, resultados de outros estudos vêm confirmando que esta molécula e seus metabólitos reduzem o estresse oxidativo *in vitro*, seja por meio da eliminação direta de reagentes à base de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (PEYROT; DUCROCQ, 2008; TAN et al., 2007), ou estimulando a atividade de diferentes enzimas antioxidantes (REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004).

Na Figura 2 é possível observar a atuação da melatonina sobre as diversas substâncias e enzimas do processo de estresse oxidativo.

Figura 2 - Reagentes e enzimas antioxidantes que sofrem ação da melatonina. Em vermelho, reagentes à base de oxigênio. Em azul, reagentes à base de nitrogênio. *: produtos eliminados diretamente pela melatonina; (↑): enzimas antioxidantes estimuladas pela melatonina; (↓) enzimas pró-oxidativas inibidas pela melatonina. GSH: glutathion; GSR: glutathionaredutase; GPX: glutathionaperoxidase; SOD: superóxido desmutase; CAT: catalase; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; MPO: mieloperoxidase; GCL: glutamilmcisteínaligase; O₂: oxigênio molecular; O₂^{•-}: radical superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; OH[•]: radical hidroxila; GSSG: glutathiona oxidada; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.



Fonte: Reiter, Fuentes-Broto e Tan (2010).

Visando avaliar os efeitos da melatonina sobre a viabilidade espermática, alguns estudos foram realizados em sêmen de mamíferos e, de maneira geral, apresentaram resultados satisfatórios (GHAZALEH et al., 2015; LI et al., 2012; PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013). Em peixes, até o momento, ainda não foram publicados dados referente à utilização deste antioxidante em sêmen criopreservado.

Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013), trabalhando com a criopreservação de sêmen de touros da raça Holstein bulls, com doses de 0.1, 1, 2, 3 e 4 mM de melatonina, observaram que os melhores resultados quanto aos parâmetros seminais avaliados e os maiores valores para a atividade da enzima catalase foram para as soluções com as concentrações de 2 mM e 3 mM. Em contrapartida, a dose de 4 mM diminuiu as taxas de motilidade e viabilidade dos espermatozoides, quando comparada aos demais tratamentos, não sendo recomendada para a espécie em questão.

Corroborando o achado no estudo de Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013), Perumal, Vupru e Khate (2013), ao trabalharem com o resfriamento de sêmen de touros *Bos fontali*, a 4 °C, durante 30 horas, concluíram que a dose de 3 mM foi eficiente na manutenção da qualidade seminal, diferentemente da dose de 4 mM, que apresentou os piores resultados. De acordo com os autores, a dose de 4 mM do antioxidante, neste caso, foi excessiva, tornando-se tóxica e provocando danos como fluidez exacerbada da membrana do espermatozoide e alterações do seu estado fisiológico normal, além de reduzir ERO a níveis extremos, impedindo que exercessem funções essenciais às células. Os resultados indicam, portanto, que a melatonina age de forma dose-dependente, além de variar de acordo com a espécie, o tempo e o modo de incubação e armazenamento.

2.8 Avaliação da qualidade do sêmen

Alterações ultraestruturais dos espermatozoides podem influenciar diretamente a redução de sua motilidade e, conseqüentemente, a sua capacidade de fertilização (STREIT JUNIOR et al., 2008). A avaliação é realizada por meio da observação dos espermatozoides em microscopia de luz e as alterações são classificadas de maneira subjetiva (MELO-MACIEL et al., 2012).

Diversos são os fatores que causam defeitos morfológicos nos espermatozoides de peixes, podendo as alterações ser divididas em alterações primárias ou alterações secundárias. As alterações primárias são as oriundas de fatores que acometem os reprodutores durante o processo de espermatogênese, como restrição alimentar, consanguinidade e estresse ambiental. São elas: cabeça degenerada, macrocefalia, microcefalia, peça intermediária degenerada, cauda quebrada, cauda pequena e cauda fortemente enrolada. O segundo grupo, chamado de alterações secundárias, é o de alterações oriundas de procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen (como massagem abdominal e o tipo de hormônio aplicado no reprodutor) e da

confeção das lâminas para as análises. São elas: cabeça normal sem cauda, cauda levemente dobrada, gota proximal e gota distal, conforme metodologia utilizada por Miliorini et al. (2011).

A motilidade é o parâmetro mais utilizado para a avaliação da qualidade seminal, no entanto, não deve ser utilizada como único indicador da qualidade seminal (COSSON et al., 2008; MURGAS et al., 2011). Sua utilização, associada a outras avaliações, torna mais eficiente e confiável a caracterização espermática.

Em peixes nativos, a taxa de motilidade pode ser estimada por meio da observação da movimentação dos espermatozoides em microscópio óptico, expressando os resultados em porcentagem de células móveis (CANEPPELE, 2011; MARIA et al., 2010; MURGAS et al., 2004; ORFÃO, 2010; SANCHES et al., 2009; WITECK et al., 2011).

Essas mensurações realizadas levantam questionamentos acerca de sua validação, pois dependem somente da experiência do avaliador, e foi demonstrado em um estudo 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 (RURANGWA et al., 2001; WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007). O *computer assisted sperm analyzer* (CASA), ou Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen, é o método mais objetivo e abrangente para a quantificação da qualidade seminal disponível na atualidade, pois fornece informações acuradas, precisas e significativas da movimentação dos espermatozoides, bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004; WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007).

Entretanto, apesar das inúmeras vantagens na utilização do programa, sua utilização 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 (Sperm Class Analyzer - SCA®), apresenta custo bastante elevado. Para a realização da quantificação do movimento das células espermáticas, o sistema utiliza pelo menos 12 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 para ele uma sequência completa de movimentação, ou seja, reconstrói a sua trajetória e classifica-a conforme padrões definidos, como móvel não progressivo, progressivo lento, progressivo rápido e imóvel. Todas as 15 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 et al., 2010).

O CASA é capaz de analisar diferentes parâmetros do movimento espermático e oferecer velocidades de trajetória, como: velocidade curvilínea (VCL), que é a velocidade da trajetória real do espermatozoide; velocidade linear progressiva (VSL), que é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide e velocidade média do percurso (VAP), que é a velocidade da trajetória média do espermatozoide. Todas essas velocidades são dadas em $\mu\text{m/s}$ (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Outro importante parâmetro de avaliação da qualidade espermática é a avaliação do estresse oxidativo no sêmen, pois pode elucidar muito sobre o potencial de fertilização da célula espermática, visto que os radicais livres são produzidos nesse processo e podem causar sério danos às membranas plasmática e mitocondrial da célula espermática (SOUZA; MORAES; TONIOLLI, 2017).

Os radicais livres produzidos nos processos de estresse oxidativo podem ser reativos ao oxigênio (radical superóxido - O_2^- , peróxido de hidrogênio - H_2O_2 e radical hidroxila - OH^-) ou ao nitrogênio (óxido nítrico - NO^- , óxido nitroso - N_2O_3 , ácido nitroso - HNO_2 , nitritos - NO_2^- , nitratos - NO_3^- e peroxinitritos - ONOO^-). São avaliados por meio da quantificação das enzimas catalase, superóxido dismutase e quantidade de óxido nítrico (SOUZA et al., 2016).

Por último, mas não menos importante, 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 mais bem aproveitados, aumentando-se o número de ovos e de embriões viáveis. Além disso, possibilita que o sêmen de um mesmo animal seja utilizado para fertilizar ovócitos de diferentes fêmeas (BILLARD; COSSON, 1992), sendo implantada em larga escala, principalmente por programas comerciais e de repovoamento de rios.

O processo de congelamento, como anteriormente citado, induz muitos danos aos espermatozoides e, mesmo que 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 (SHIMODA et al., 2007). Logo, a taxa de fertilização funciona como um ótimo parâmetro de avaliação da qualidade seminal e é requisito imprescindível para tornarem válidas as técnicas empregadas no estudo, visto que 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 sobre se a avaliação desse parâmetro pode ser feita de forma isolada, dado que pode ser influenciada por uma série de condições (RURANGWA et al., 2001; WITECK et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, Oxford, v. 95, p. 503-507, 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: II., effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, p. 1-14, 2006.
- AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, p. 317-325, 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, p. 25-30, 2013.
- BAKER, M. A.; AITKEN, R. J. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 216, p. 47-54, 2004.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2005. 470 p.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, p. 257-267, 2008.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, p. 1061-1069, 2001.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BEDORE, A. G. **Características 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**, New York, v. 27, p. 202-209, 2009.

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

BILODEU, 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**, Stonehan, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, Feb. 2002.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, London, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BORELLA, M. I. et al. Gametogênese e o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Ed.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: Ed. FUNEP, 2014. p. 285-305.

BORGES, J. C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção**. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

BRITO, M. F. G.; BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 623-633, 2003.

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**, Oxford, v. 140, n. 1, p. 11-17, 2005.

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

CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 432, p. 389-401, 2014.

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, p. 189-195, 2011.

CANEPELE, 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. et al. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status.** Ottawa: World Fisheries Trust, 2003. 373 p.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática.** 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.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstract...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 511.

CHEN, Y. K. et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 2, p. 189-193, 2010.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species.** Baton Rouge: 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**, Oxford, v. 69, p. 97-104, 1999.

COS, S. et al. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, p. 4383-4390, 1998.

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

COSSON, J. et al. 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, 2008.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus =scrofa*) (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, 2008.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species by family/subfamily.** San Francisco: California Academy of Sciences, 2017. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

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, p. 259-263, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREATO, T. **A morfometria, rendimento no processamento e inter-relações na avaliação de carcaça de piracanjuba, Brycon orbignyanus (VALENCIENNES, 1849)**. 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97-140.

GHAZALEH, I. et al. Melatonin has a beneficial effect on stallion sperm quality in cool condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 35, p. 555-559, 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, p. 1922-1930, 2001.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 63, p. 445-457, 2005.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agopecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, mar./abr. 2000.

GONÇALVES, A. C. S. et al. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod *Prochilodus lineatus* and piracanjuba *Brycon orbignyanus*. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, p. 62-70, 2013.

GUIMARÃES, D. B. et al. Sperm quality during the cooling curve of swine semen diluted in coconut water extender aiming your cryopreservation. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 19, p. 1-16, 2018.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAGEDORN, M. et al. Oxidative stress in Zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.

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**, v.53, p.47-58, 2000.

INGERMANN, R. L. Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. In: _____. **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science, 2008. p. 241-266.

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

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

KOPEIKA, E. et al. Sperm cryopreservation of fish. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totow: Humana, 2007. p. 203-217. (Series Methods in Molecular Biology, 368).

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, p. 130-140, Sept. 2010.

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

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.

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

LEITE, L.V. 2011. Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma Macropomum*). Fortaleza (Ce): Universidade Estadual do Ceará.. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil, 72f.

LEUNG, L. K. P. Principles of biological cryopreservation. In: JAMIESON, G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: 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**, Belfast, v. 47, p. 299-307, 2012.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JUNIOR, C. J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 330-350.

LINHARES, F. R. A. et al. Efeito de vitaminas adicionadas ao diluente ACP-104 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carpa comum - *Cyprinus carpio*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 4, p. 980-988, jul./ago. 2017.

LOPERA-BARRERO, N. M. **Diversidade genética de Brycon orbignyanus em sistema reprodutivo seminatural**. 2007. 92 p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelamento seminal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 29-34, jan./mar. 2016.

LÓPEZ, D. I.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition and osmolality affects post-thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 31, p. 114-118, 2015. Supplement 1.

MAIA, M. S. et al. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Trisegg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 85-90, 2009.

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, p. 298-306, 2006.

MARIA, A. N. et al. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, p. 779-783, 2010.

MARTÍN-HIDALGO, D. et al. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 C. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 75, p. 1550-60, 2011.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. et al. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 66, p. 333-338, 2013.

MARTÍNEZ, J. G.; TARAZONA-MORALES, A. M.; PARDO-CARRASCO, S.C. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. **Anim. Reprod.**, v.9, n.1, p.00-00, Jan./Mar. 2012.

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, 2008.

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

METWALLY, M. A. A.; FOUAD, I. M. Effects of l-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Global Veterinaria**, Deira, v. 3, p. 132-136, 2009.

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

- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. 1 CD-ROM.
- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquacult. Res.*, v.42, p.177-187, 2011.
- MINS, S. D. et al. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 123-129.
- MOREIRA, A. B. et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian Brycon Freshwater Fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 14, p. 565-574, Nov./Dec. 2001.
- 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: Cache Rive Press, 1999. p. 149-160.
- MUCHLISIN, A. Z. Review: current status of extenders and cryoprotectants on fish Spermatozoa Cryopreservation. **Biodiversitas**, Surakarta, v. 6, p. 12-15, 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, 2011.
- MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, dez. 2004.
- 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, 2013.
- NAVARRO, O.J.; SANTAMARÍA, Y.M.V.; CASALLAS, P.E.C. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). **Rev. Col. Cienc. Pec.**, 17: Suplemento, 2004.
- NAVARRO, R. D. et al. Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. **Acta Scientiarum: Technology**, Maringá, v. 36, p. 55-60, 2014.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 15, p. 267-271, 2007.
- NUNES, L. T. et al. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 1643-1654, maio/jun. 2016.

OLIVEIRA, D. J. et al. Conservation Status of the “Piracanjuba” *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae): basis for management programs. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, DF, v. 7, n. 1, p. 18-33, 2017.

ORFÃO, L. H. **Diversidade genética de populações e criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 368, p. 39-57, 2007.

PÉREZ-CEREZALES, S. et al. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, p. 282-289, 2010.

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**, London, v. 2013, p. 1-10, 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**, Copenhagen, v. 45, p. 235-246, 2008.

PIANTADOSI, C. A. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 45, p. 562-569, 2008.

PINHEIRO, J. P. S. et al. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 2, p. 267-273, abr./jun. 2016.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, p. 273-279, 2004.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, Oxford, v. 12, p. 151-180, 1991.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. **Journal of Biomedical Science**, London, v. 7, n. 6, p. 444-458, Nov./Dec. 2000.

REITER, R. J.; FUENTES-BROTO, L.; TAN, D. X. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in Brain Research**, Copenhagen, v. 181, p. 127-151, 2010.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 36, p. 1-9, 2004.

RURANGWA, E. et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 55, p. 751-769, 2001.

- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Reproductive Biotechnology in Fresh Water Fish. In: V Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal. Patos, Paraíba, 2010. Anais.
- SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. et al. Meios de Congelação para a conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, edição especial, v.22, n.1, p.255-268, 2012.
- SANCHES, E. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, p. 2091-2098, 2009.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 10, p. 308-313, 2004.
- SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A. et al. Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 58, p. 313-320, 2013.
- SHIMODA, E. et al. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 315, p. 430-433, 2007.
- SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de Curimba (*Prochilodus lineatus*) Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 7, p. 657-664, jul. 2016.
- SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; TONIOLLI, R. Addition of antioxidants in ram semen and the effects after thawing. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 5, p. 471-478, maio 2017.
- STREIT JUNIOR, D. P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus brasiliensis*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, p. 337-344, 2008.
- TAN, D. X. et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 34, p. 75-78, 2003.
- 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**, Copenhagen, 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, 2012.
- VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 78, n. 3, p. 687-721, July 1998.

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

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

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

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

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 858-865, 2011.

VIVEIROS, A.T.M; ISAÚ Z.A; CANEPPELE, D; LEAL, M.C. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology*, , Available online 26 April 2012.

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**, Los Angeles, v. 67, p. 661-672, 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, 2011.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 149, p. 224-232, 2009.

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

ZANIBONI-FILHO, E.; BALDISSEROTTO, B. Congelamento de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 189-194, 2015.

ZANIBIONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguai river. In: CAROSFELD, J. et al. (Ed.). **Migratory fishes of the South America: biology, fisheries and conservation status**. Victoria: World Fisheries Trust, 2003. p. 161-192.

ZILLI, L. et al. Aquaporin inhibition changes protein phosphorylation pattern following sperm motility activation in fish. **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, n. 4, p. 737-744, Sept. 2011.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1****AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DE PIRACANJUBA SUBMETIDO AO
CONGELAMENTO UTILIZANDO SOLUÇÕES COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA**

Artigo segue as normas e formato da UFLA

*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

Avaliação da qualidade do sêmen de piracanjuba submetido ao congelamento utilizando soluções com diferentes concentrações de melatonina

[Evaluation of the quality of semen of piracanjuba subjected to freezing using solutions with different concentrations of melatonina]

Priscila C. Palhares ^a, Isadora de L. Assis^b, José Gilmar da Silva Souza ^b, Thales de Souza França ^b, Renata Catão Egger ^b, Luis David Solis Murgas ^{b*}.

^a Departamento de Zootecnia, IF do Sudeste de MG, Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil

^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor para correspondência: Dr. Luis David Solis Murgas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Caixa Postal: 3037, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

RESUMO

O piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie de peixe reofílica que se encontra, atualmente, em risco de extinção. A criopreservação de sêmen é uma técnica que permite o armazenamento dos gametas em longo prazo, sendo uma excelente estratégia de repovoamento. Porém, essa biotecnologia pode causar injúria na célula espermática. A adição de antioxidantes à solução de criocongelamento pode ajudar a proteger os espermatozoides contra os danos causados por radicais livres. Dessa forma, objetivou-se, com este trabalho, verificar a viabilidade das células espermáticas de *B. orbignyanus* congeladas utilizando-se meios contendo diferentes concentrações de melatonina. Utilizou-se o sêmen de 15 machos adultos com peso médio de 1.160 ± 120 g, que resultou em cinco *pools* contendo o sêmen de três animais aleatórios. Utilizaram-se, para a fertilização, ovócitos de cinco fêmeas com peso médio de 1.320 ± 260 g. Os animais foram induzidos hormonalmente com duas doses (0,5 mg e 5,0 mg/kg PV) de extrato hipofisário de carpa e a coleta realizada por meio de uma leve massagem celomática. O sêmen *in natura* foi caracterizado avaliando-se a taxa de motilidade, o tempo de motilidade, a concentração, o pH, o volume, o vigor, a cor e o aspecto. O sêmen foi diluído na proporção 1:9 (sêmen:diluidor) nos seguintes tratamentos: (C) 10% metilglicol (MG) + 5% *beltisville thawing solution* (BTS); (M1) 5% de BTS + 10% MG + 1 mM de melatonina; e (M2) 10% metilglicol (MG) + 5% BTS + 2 mM de melatonina. No congelamento, utilizaram-se três diferentes tempos de permanência no *dry shipper*: T1 (15 minutos), T2 (12 horas) e T3 (24 horas). Após cada um desses tempos, as amostras foram transferidas e estocadas em botijão de nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas em banho-maria, a 60 °C, por 5 segundos e avaliadas quanto à vitalidade, à morfologia e à motilidade com o auxílio do software *Sperm class analyser* (SCA) e à taxa de fertilização. Os dados foram analisados utilizando-se o programa R. Para testar a normalidade foi utilizando o teste de Shapiro-Wilks e, em seguida, efetuou-se a análise de variância (*one-way ANOVA*). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, quando constatado efeito significativo ($p < 0,05$). As características do sêmen *in natura* encontram-se de acordo com o relatado por outros autores. Somente para a taxa de fertilização foi observada diferença estatística significativa na interação entre as soluções e tempos no *dry shipper*. A solução M2 no tempo de 12 horas no *dry shipper* apresentou o melhor resultado ($8,40 \pm 2,54\%$). As soluções contendo melatonina se destacaram em relação à solução controle e a solução M2 apresentou os maiores resultados para taxa de vitalidade ($85,2 \pm 2,8\%$), taxa de motilidade ($64,63 \pm 8,3\%$), tempo de motilidade ($84,22 \pm 11,4$ segundos) e motilidade progressiva ($17,01 \pm 1,2\%$). Com relação à morfologia espermática, observou-se um maior número de células anormais quando se utilizou a solução controle ($57,4 \pm 5,9\%$). Conclui-se que a adição de melatonina na concentração de 2 mM, associada ao crioprotetor metilglicol na solução de criocongelamento, melhorou a qualidade espermática, independentemente do tempo de congelamento no *dry shipper*.

Palavras-chave: CASA, motilidade espermática, *Brycon orbignyanus*, criopreservação, antioxidante, *dry shipper*.

ABSTRACT

The piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) is a species of rhophilic fish that is currently in danger of extinction. Semen cryopreservation is a technique that allows the storage of the gametes in the long term, being an excellent strategy of repopulation. But this biotechnology can cause sperm cell injury. The addition of antioxidants to the cryo-freeze solution can help protect sperm from damage from free radicals. Thus, the objective of this work was to verify the viability of the frozen sperm cells of *B. orbignyanus* using media containing different concentrations of melatonin. Seeds of 15 adult males with a mean weight of 1160 ± 120 g were used, which resulted in 5 pools containing the semen of 3 random animals. For fertilization, oocytes of 5 females with a mean weight of 1320 ± 260 g were used. The animals were hormonally induced with two doses (0.5mg and 5.0mg / kg PV) of carp pituitary extract and the collection was performed through a mild celomathic massage. The semen *in natura* was characterized by evaluating the motility rate, motility time, concentration, pH, volume, vigor, color and appearance. The semen was diluted 1: 9 (semen: thinner) in the following treatments: (C) 10% methylglycol (MG) + 5% *Beltisville Thawing Solution* (BTS); (M1) 5% BTS + 10% MG + 1mM melatonin; and (M2) 10% methylglycol (MG) + 5% *Beltisville Thawing Solution* (BTS) + 2mM melatonin. During freezing, three different dry stay times were used: T1 (15 minutes); T2 (12 hours); T3 (24 hours). After each of these times, the samples were transferred and stored in a liquid nitrogen canister. Samples were thawed in a water bath at 60°C for 5 seconds and evaluated for vitality, morphology, motility with the aid of the *Sperm Class Analyser* (SCA) software and fertilization rate. The data were analyzed using the R program. To test for normality, the Shapiro-Wilks test was used, followed by analysis of variance (*one-way ANOVA*). The averages were compared by the Duncan test when a significant effect was found ($p < 0.05$). The characteristics of semen *in natura* are in agreement with the one found by other authors. Only for the fertilization rate was observed a statistically significant difference in the interaction between solutions and times in the *dry shipper*. The solution M2 in the time of 12h in the *dry shipper* presented the best result ($8.40 \pm 2.54\%$). The solutions containing melatonin showed a higher rates of vitality ($85.2 \pm 2.8\%$), motility rate ($64.63 \pm 8.3\%$), motility time (84.22 ± 11.4 seconds) and progressive motility ($17.01 \pm 1.2\%$). Regarding sperm morphology, a higher number of abnormal cells was observed when the control solution ($57.4 \pm 5.9\%$) was used. It was concluded that the addition of 2mM melatonin, combined with the cryoprotective methylglycol in the cryoclock solution, improved the sperm quality, regardless of the freezing time in the *dry shipper*.

keywords: CASA, sperm motility, *Brycon orbignyanus*, cryopreservation, antioxidant, *dry shipper*.

1 INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849), como é popularmente conhecida, é uma espécie de peixe de água doce, nativa da bacia dos rios Paraná e Uruguai. É um peixe que migra por longas distâncias para se reproduzir, subindo o rio entre os meses de setembro e outubro, culminando com a desova entre novembro e janeiro (CASTAGNOLLI, 1992).

Esta espécie vem apresentando um declínio populacional acentuado, encontrando-se extinta em quase toda a extensão da bacia de origem e está categorizada como em perigo de extinção pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008). As causas desse declínio são, principalmente, a sobrepesca, o desmatamento, a poluição, a mudança no regime hidrobiológico, a introdução de espécies exóticas e a fragmentação ambiental. Uma importante causa da redução populacional dessa espécie é a construção de barragens nos rios, pois essa redução de corpos d'água por represamento retarda o período reprodutivo dos peixes (ANDRADE et al., 2015; FIDALGO-GUERREIRO; FERREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2014). A criação dessa barreira intransponível à sua migração bloqueia o movimento dos peixes para partes superiores da bacia, aumentando a mortalidade de juvenis, devido ao fato de a desova ocorrer fora das condições adequadas para o seu desenvolvimento (CHAPMAN et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

Para atenuar esse declínio das populações de peixes migratórios, se faz necessária a adoção de diferentes estratégias de conservação. Dentre elas, pode-se citar a criação de bancos de germoplasma animal, por meio do criocongelamento de sêmen dessas espécies para posterior disponibilização desse material (GALO et al., 2011).

Além de ser uma técnica que permite o armazenamento dos gametas em longo prazo, a criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que pode aumentar a flexibilidade e a operacionalização do período reprodutivo e dos programas de reprodução assistida em peixes (CABRITA et al., 2013). Mas, por ser um processo que pode gerar cerca de 50% de danos às células devido ao congelamento e ao descongelamento, o sucesso da criopreservação é parcial. Esses danos podem ocorrer devido à formação de cristais de gelo no interior da célula, por toxicidade da solução utilizada no processo ou, ainda, pela sensibilidade da célula espermática ao estresse oxidativo em decorrência das espécies reativas de oxigênio (ERO) (SALMITO-VANDERLEY; ALMEIDA-MONTEIRO; NASCIMENTO, 2016).

A célula espermática é muito sensível ao estresse oxidativo que ocorre durante o processo de congelamento. Devido à baixa quantidade de antioxidantes e à alta concentração

de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática, são formadas as ERO (BUCAK et al., 2007). Altas concentrações de ERO podem prejudicar as funções celulares, como a motilidade do espermatozoide (DU et al., 2009).

Os espermatozoides e o plasma seminal têm enzimas e antioxidantes responsáveis pela remoção dos radicais livres. No entanto, isso não é suficiente para a proteção celular (SANCHES; TOSTA; SOUZA-FILHO, 2013). A melatonina é um antioxidante capaz de sequestrar radicais livres altamente reativos, neutralizando o radical hidroxila (OH), considerado como o radical mais reativo em sistemas biológicos, com maior eficiência que a glutathione reduzida (antioxidante endógeno) e o manitol (antioxidante observado em plantas). A adição de antioxidantes no meio de congelação protege os espermatozoides contra os danos causados pelos radicais livres (LOPES; SALMITO-VANDERLEY; ALMEIDA-MONTEIRO, 2016), mas não foram encontrados, até o momento, estudos que relatem o uso de melatonina no congelamento de sêmen de peixes. Em trabalhos com outras espécies animais tem sido demonstrada bastante eficiência dessa molécula na preservação do sêmen criocongelado (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; GHAZALEH et al., 2015; LI et al., 2013; PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013; SOUZA et al., 2016).

O objetivo, neste estudo, foi o de verificar a viabilidade das células espermáticas de *B. orbignyana* congeladas em meios contendo diferentes concentrações de melatonina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, animais e período pré-experimental

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da comissão de ética da Universidade Federal de Lavras (processo nº039/13) e foi desenvolvida durante os meses de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, na Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Volta Grande. Foram selecionados 15 machos adultos de Piracanjuba (1.160 ± 120 g) e cinco fêmeas adultas (1.320 ± 260 g) e mantidos em tanques de concreto com água corrente, à temperatura de 28 °C a 30 °C. Os reprodutores apresentavam características sexuais secundárias, como presença de orifício genital avermelhado e cavidade celomática abaulada (fêmeas), e liberação de sêmen sob compressão na parede celomática (machos).

A hipofisacção dos animais foi conforme metodologia adotada na Estação de Piscicultura Cemig - Volta Grande, para machos e fêmeas.

2.2 Coleta do sêmen

O sêmen foi coletado colocando-se os peixes sobre uma superfície plana e tiveram os olhos cobertos por um pano úmido. A papila urogenital foi seca com papel toalha e, em seguida, foi feita a extrusão do sêmen por meio de uma massagem manual na parede celomática, no sentido crânio caudal. O sêmen foi coletado em tubos de ensaio graduados e colocados dentro de uma caixa de isopor contendo gelo em barra, onde foram mantidos até o momento do congelamento.

A avaliação da ativação prévia do sêmen foi feita logo após a coleta. Foi observada, em microscópio óptico, uma alíquota de 5 µL de sêmen de cada macho, depositada em lâmina histológica de vidro e, quando constatada ausência de movimentação dos espermatozoides, o sêmen foi homogeneizado, com 40 µL de ativador NaHCO_3 1% (MARIA et al., 2006), para avaliação subjetiva da motilidade espermática e da duração da motilidade. Foram utilizadas apenas as amostras que apresentaram taxa de motilidade superior a 80%.

Foram feitos cinco *pools* contendo sêmen de três animais em cada *pool*. Os animais foram selecionados de forma aleatória.

2.3 Criopreservação do sêmen

A criopreservação foi realizada utilizando-se soluções contendo 10% de metil glicol (Maria et al, 2006), diluídas em 5% de BTS (constituído de 79,90 g de glicose, 12,71 g de citrato de sódio, 2,65 g de EDTA, 2,65 g de bicarbonato de sódio, 1,59 g de cloreto de potássio e 0,50 g de sulfato de gentamicina em 1,00 L de água destilada) e adicionadas de concentrações diferentes de melatonina (1 mM e 2 mM), resultando nos seguintes tratamentos:

- a) controle: 5% de BTS + 10% MG;
- b) M1: 5% de BTS + 10% MG + 1 mM de melatonina;
- c) M2: 5% de BTS + 10% MG + 2 mM de melatonina.

A osmolaridade de todas as soluções foi testada e quando necessário foi feito o ajuste da solução para 320 mOsm com cloreto de cálcio (FELIZARDO et al., 2011; SHIMODA et al., 2007).

Para testar a toxicidade da solução, uma alíquota (10 µL) de cada *pool* foi colocada sob uma lâmina histológica de vidro e, em seguida, foi adicionada uma alíquota da solução crioprotetora (10 µL). Em microscópio ótico observou-se a presença/ausência de motilidade. Quando constatado que a solução não foi capaz de ativar os espermatozoides, prosseguiu-se adicionando-se, na mesma lâmina, uma alíquota (10 µL) da solução ativadora e novamente observou-se a motilidade espermática.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 (sêmen: meio de congelamento) e envasadas em palhetas de 0,5 ml, identificadas e vedadas com álcool polivinílico (PVA).

Após aguardar o tempo de estabilização da solução (10 minutos), as palhetas contendo o sêmen diluído foram acondicionadas em raques de polietileno e congeladas à temperatura de, aproximadamente, -170 °C (-35,6 °C/min) (MILIORINI et al., 2011), utilizando-se um botijão de vapor de nitrogênio, tipo *dry shipper* (DS; Taylor-Wharton, modelo CP 300; -170 °C), onde permaneceram por três tempos diferentes e, em seguida, foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido, a -196 °C (Cryometal, modelo DS-18), permanecendo estocadas até o momento das análises. Os tempos de permanência testados no DS foram de 15 minutos (OLIVEIRA et al., 2014), 12 horas (VARELA JUNIOR et al., 2015) e 24 horas (MARIA et al., 2006).

Para o descongelamento, as palhetas foram retiradas do botijão e submergidas imediatamente em banho-maria, a 60 °C, por oito segundos (MURGAS et al., 2004). Em

seguida, alíquotas foram separadas para posteriores análises de vitalidade, cinética espermática, tempo de motilidade e morfologia.

2.4 Avaliação das características seminais

Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto às características seminais de volume, pH, cor, aspecto, concentração, motilidade total, tempo de motilidade e vigor espermático. Volume, cor e aspecto do sêmen foram avaliados por meio da observação direta em tubos de vidro graduados, nos quais foram coletados.

O pH foi mensurado com o auxílio de fitas medidoras (MERCK- Alemanha) e a concentração foi estimada em câmara hematimétrica Neubauer “Improved”.

A concentração espermática foi mensurada utilizando-se os métodos de contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer, espermatozoides. mL⁻¹ (WIRTZ; STEINMANN, 2006). Foi realizada a análise no sêmen de cada animal individualmente.

Para a motilidade, uma mesma pessoa estimou, de forma subjetiva, observando em microscópio ótico, sob o aumento de 400x, a porcentagem média de células móveis em três diferentes campos e atribuindo um valor numa escala de 0 a 100%. A ativação das células para a análise foi realizada misturando-se uma parte de sêmen para cinco partes de solução de NaHCO₃ 1% (MARIA et al., 2006). A duração da motilidade foi determinada desde a homogeneização do sêmen com a solução ativadora até que restassem apenas 10% de espermatozoides móveis, com o auxílio de um cronômetro.

Para o vigor, foi observada, em microscópio ótico, a movimentação dos espermatozoides e, em seguida, foram atribuídos valores de 0 a 5 pontos, conforme metodologia de Streit Junior et al. (2009).

2.5 Vitalidade espermática

O método de coloração eosina-nigrosina, adaptado de Bloom (1950), utilizando a proporção 1:10:10 (sêmen:eosina:nigrosina), foi escolhido para a realização desta análise, sendo a contagem de 200 células em campos distintos da lâmina histológica observada em microscópio ótico. Para o cálculo da taxa de vitalidade, foram contadas as células com membrana intacta (vivas) que se apresentaram incolores e as células com algum rompimento da membrana plasmática (mortas) que se apresentaram coradas de rosa ou vermelho (MARIA et al., 2012).

2.6 Motilidade espermática

As análises de motilidade pós-descongelamento do sêmen foram realizadas de forma objetiva por meio de um sistema de análise computadorizada, utilizando-se o software SCA® (Sperm class analyzer® - SCA, 2005, Microptics, S.L., versão 3.2.0).

Em um microtubo tipo eppendorff, contendo 300 µl de ativador – NaHCO₃ 1%, foi adicionada uma alíquota de 10 µl de sêmen e homogeneizou-se. Dessa solução, imediatamente após a ativação, 2 µl foram retirados, colocados em câmara hematimétrica de Mackler (profundidade 10 µm) e observados em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Eclipse E200®, Tóquio, Japão), sob aumento de 20 dioptrias, com filtro amarelo, na posição pH1. Esse microscópio está acoplado a uma câmera de vídeo (Blaster Vision Technologies® A602FC, Ahrensburg, Alemanha) que gera 25 imagens por segundo por meio das quais os parâmetros de motilidade foram calculados. A gravação do vídeo foi iniciada 10 segundos pós-ativação. As imagens (n=25) foram analisadas utilizando-se a configuração padrão para peixes do software *Sperm Class Analyzer* (SCA®, Microptics, Versão 5.1 SL, Barcelona, Espanha). Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MP - %), velocidade curvilínea (VCL - µ/s), velocidade em linha reta (VSL - µ/s), velocidade média de deslocamento (VAP - µ/s), retilinearidade (STR - µ/s) e linearidade (LIN - µ/s). Foram analisados, aproximadamente, 500 espermatozoides/campo

A duração da motilidade no sêmen descongelado, assim como no sêmen *in natura*, foi mensurada com o auxílio de um cronômetro, iniciando desde a homogeneização do sêmen com a solução ativadora até que 90% dos espermatozoides permanecessem imóveis.

2.7 Morfologia das células espermáticas

Uma alíquota de 10 µl de sêmen descongelado foi diluída em 990 µl de solução de formol-citrato. Em seguida, uma fração de 10 µl da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica e coberta por lamínula. A análise consistiu da observação, em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Eclipse Ci-S, China) na objetiva de 100x, das alterações morfológicas de 100 espermatozoides focalizados em campos distintos ao longo da lâmina.

Foram observadas as seguintes alterações morfológicas de cabeça, peça intermediária e cauda, conforme metodologia descrita por Miliorini et al. (2011):

- a) alterações morfológicas primárias: cabeça - microcefálica, macrocefálica, degenerada; peça intermediária – degenerada e cauda – fraturada, fortemente enrolada e degenerada;

- b) alterações morfológicas secundárias: cabeça - isolada normal; peça intermediária – gota proximal e cauda – isolada, levemente dobrada e gota distal.

2.8 Fertilização

Das cinco fêmeas selecionadas, apenas três responderam à indução hormonal.

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada e utilizada para a fertilização. Uma alíquota de 100 µl de sêmen de cada palheta foi utilizada para fertilizar 0,1 g de ovócitos de três fêmeas. A fertilização foi iniciada adicionando-se 10 ml de solução de NaHCO₃ 1% (MARIA et al., 2006). ativador ao sêmen, juntamente com o ovócito. Em seguida, os ovos foram transferidos para incubadoras experimentais, confeccionadas de cano de PVC (100 mm de diâmetro) com fundo telado (400 µm), dispostas em tanques de concreto com água corrente à temperatura de 28 °C a 30 °C.

Para estimar a taxa de fertilização foram realizadas duas amostragens individuais de cada incubadora e contados cerca de 100 ovos em estereoscópio binocular.

2.9 Análises estatísticas

Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições (*pool* de três peixes) e nove tratamentos dispostos em estrutura fatorial 3 x 3 (soluções x tempo de permanência em *dry shipper*). Os dados foram analisados utilizando-se o programa R e foram expressos na forma de média e desvio padrão. Para testar a normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks e, em seguida, efetuou-se a análise de variância (*one-way ANOVA*), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey quando constatado efeito significativo ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características seminais

Os parâmetros avaliados para a caracterização do sêmen *in natura* da espécie estudada podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características do sêmen *in natura* de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

PARÂMETROS	PIRACANJUBA
Coloração	Esbranquiçada
Aspecto	Leitoso
Volume (ml)*	7,6±1,1
Concentração espermática (espermatozoides/ml)*	5,88±1,2 x 10 ⁹
pH sêmen*	8,2±0,32
Motilidade total (%)*	94±5,48
Vigor*	4,0±0,82
Tempo de motilidade (segundos)*	117,2±51,4

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: Da autora (2018).

A coloração esbranquiçada e o aspecto leitoso encontrados neste estudo foram também relatados por Oliveira et al. (2014). No entanto, o volume encontrado por estes mesmos autores foi inferior. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o autor não ter realizado a indução hormonal dos machos. Sendo a indução hormonal, uma prática que pode ser utilizada visando o aumento do volume do sêmen extrusado (ÓRFÃO, 2013).

O pH do sêmen não apresenta relevante efeito sobre a ativação dos espermatozoides de peixes (CHRISTEN; SCHACKMANN; SHAPIRO, 1983), porém, em estudo realizado por Lahnsteiner et al. (1996) foi relatada uma significativa relação entre o pH do sêmen e espermatozoides móveis em *Alburnus alburnus* (Ciprinidae), sugerindo que este parâmetro seja uma característica importante do plasma seminal e que pode influenciar o potencial de mobilidade dos espermatozoides (ALAVI; COSSON, 2005). No presente estudo, os valores de pH encontrados são similares aos relatados por Mojica (2004) em *B. orbignyanus* (8,5) e *B. hilarii* (8,0).

O valores encontrados para concentração espermática no presente trabalho estão próximos ao relatado por Maria et al. (2006) que relataram, para *Brycon orbignyanus*,

concentração de $5,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Murgas et al. (2004) encontraram, para esta mesma espécie, média de $8,21 \pm 2,26 \times 10^9$ espermatozoides/mL, valor também próximo ao encontrado neste estudo.

Um dos principais requisitos a se considerar na qualidade espermática de peixes é a motilidade dos espermatozoides (GODINHO, 2000), a qual pode ser influenciada por uma série de fatores, como temperatura, condições de análise, manejo e estresse dos doadores. Os valores da motilidade do sêmen encontrados neste estudo estão de acordo com os relatados por outros autores para a espécie em estudo (FELIZARDO et al., 2016; MARIA et al., 2006; MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003).

O parâmetro avaliado de forma subjetiva, que caracteriza a velocidade com que os espermatozoides se movimentam, é o vigor espermático. Esse é também um importante indicador das condições do sêmen de peixes (COSSON et al., 1999; VERMEIRSEN et al., 2003). No presente estudo foi encontrado valor bastante superior aos relatados por outros autores em outras espécies reofílicas, como 2,93, em *Leporinos elongatus* (STREIT JUNIOR et al., 2008) e 3,92, em *P. mesopotamicus* (STREIT JUNIOR et al., 2009), mas corroboram o encontrado por Viveiros et al. (2015), de 5, em *B. orbignyanus*.

3.2 Vitalidade espermática

A vitalidade espermática é uma análise necessária quando se trata de protocolos de congelamento, pois é um indicador de integridade de membrana plasmática. Neste estudo, foi encontrada diferença significativa apenas entre as soluções testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Taxa de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (%) no sêmen fresco e descongelado de *B. orbignyanus* nas soluções controle, adicionada de 1mM de melatonina (M1) e adicionada de 2 mM de melatonina (M2).

	<i>In natura</i>	Controle	M1	M2
Média±DE (%) *	89,7±3,4 a	88,6±2,7 a	81,5±4,3 b	85,2±2,8 a

Os resultados são expressos como média±desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

Foi possível observar que as maiores taxas de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra ($p \leq 0,05$) foram encontradas nas amostras de sêmen *in natura*, bem como nas soluções controle e em meio contendo 2 mM de melatonina. Os valores encontrados neste estudo condizem com os encontrados por outros autores, como 82% em *B. henni* (PINEDA-

SANTIS et al., 2015) e em outras espécies reofílicas, como tabaqui, com valores entre 48% e 70%, utilizando *dry shipper* (VARELA JUNIOR et al., 2015).

Em contrapartida, a taxa encontrada por Viveiros et al. (2011), utilizando o mesmo crioprotetor que o do presente estudo em *B. ninsignis*, foi inferior ($62,0 \pm 12\%$), o que sugere uma provável atuação da melatonina associada ao crioprotetor na preservação da integridade da membrana das células espermáticas.

3.3 Motilidade espermática

A motilidade espermática é um critério da qualidade espermática que permite avaliar a eficácia do congelamento. Após o descongelamento do sêmen, os parâmetros da cinética espermática foram avaliados. No entanto, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para os parâmetros de tempo de motilidade (TM), a motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP) apenas entre as soluções (Tabela 3).

Apesar de não haver diferença significativa entre as soluções contendo melatonina (M1 e M2), é possível observar que as amostras da solução com a maior concentração de melatonina apresentaram valores mais altos para os três parâmetros, demonstrando que o crioprotetor utilizado neste estudo, juntamente com a melatonina, exerceu influência positiva quando comparado à solução controle.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão do tempo de motilidade (TM – segundos), motilidade total (MT - %) e motilidade progressiva (MP - %) do sêmen de piracanjuba descongelado.

Tratamentos	TM *	MT*	MP*
Controle	44,33±1,2 a	32,15±1,9 a	5,79±0,8 a
M1	65,33±10,2 ab	47,31±3,2 ab	13,49±1,3 b
M2	84,22±11,4 b	64,63±8,3 b	17,01±1,2 b

* Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2018).

Os espermatozoides são imóveis no plasma seminal e essa característica favorece a preservação dessa célula por meio de técnicas de congelamento, pois não há requerimento de energia para a sua locomoção. O valor de MT na solução M2 foi acima de 60% e apresentou o maior tempo de motilidade entre as soluções, mostrando ser capaz de permanecer móvel por mais tempo que os demais tratamentos. Trabalhando com *Brycon moorei*, Atencio-Garcia et al.

(2017) encontraram 84%, corroborando com os resultados encontrados neste estudo para a motilidade total, porém, com duração inferior (34%).

A progressividade observada foi consideravelmente inferior no tratamento controle, quando comparado aos tratamentos com adição de melatonina. Esses valores encontrados para as soluções contendo melatonina são maiores que os citados por Atencio-Garcia et al. (2017), em sêmen criopreservado de *B. moorei* ($7,1 \pm 4,6$). Em contrapartida, em sêmen criopreservado de *B. henni*, Pineda-Santis (2015) encontrou valores bastante superiores ao deste estudo (52% a 62%).

3.4 Morfologia espermática

Não houve interação significativa entre as soluções e os tempos testados, porém, entre as soluções foi possível observar diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), como pode observado na tabela 4.

Tabela 4 - Médias de desvio padrão da porcentagem de alterações encontradas no sêmen *in natura* e descongelado de *B. orbignyana*.

Tratamentos	Cabeça	Peça intermediária	Cauda	Totais
In natura	2,1 \pm 0,8 a	0,0 \pm 0,0 a	18,6 \pm 2,3 a	20,7 \pm 3,6 a
C	12,3 \pm 1,2 b	0,9 \pm 0,1 a	44,2 \pm 12,5 b	57,4 \pm 5,9 b
M1	4,7 \pm 1,7 a	0,2 \pm 0,1 a	38,2 \pm 9,5 b	43,1 \pm 13,2 c
M2	3,7 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0 a	36,6 \pm 14,8 b	40,3 \pm 11,4 c

* Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2018).

As amostras das soluções que continham melatonina apresentaram as menores taxas de anormalidades na célula espermática, quando comparadas à solução controle.

A avaliação da morfologia da célula espermática está altamente relacionada com o potencial fertilizante dos espermatozoides, pois a integridade das estruturas da célula é imprescindível para o bom desempenho dessa função. Dessa forma, na maioria das vezes, poderá explicar a redução da motilidade do espermatozoide e, por consequência, a perda da capacidade fertilizante dos ovócitos (STREIT JUNIOR et al., 2008).

Sendo assim, observou-se que as taxas médias de morfoanomalias totais das amostras das soluções com melatonina foram menores que 50%. Dessa forma, de acordo com Miliorini

et al. (2011), sêmen com até 50% de células anormais 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*.

As morfoanomalias que apareceram com mais frequência foram “cauda enrolada”, “cauda isolada” e “cabeça isolada”. Todas são alterações que dificultam a locomoção das células espermáticas, podendo comprometer seriamente a fertilização.

3.5 Fertilização

A taxa de fertilização foi baixa, não excedendo a 8% de ovócitos fertilizados. Não se observou efeito significativo na interação tempo e solução, porém, houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as soluções em cada tempo testado.

Foi observado que o tratamento contendo 2 mM de melatonina no tempo de congelamento de 15 minutos e de 12 horas em *dry shipper* apresentou as maiores taxas.

As menores taxas puderam ser observadas no tratamento controle em todos os tempos testados.

O tratamento M1 apresentou melhores taxas que o tratamento controle, mas se manteve constante nos diferentes tempos avaliados (Tabela 5).

Valores superiores aos encontrados neste estudo foram relatados por outros autores, na mesma espécie e em outras espécies reofílicas, como em *B. orbignyana* (45%) (FELIZARDO et al., 2010) e em *P. mesopotamicus* ($59,01 \pm 25,69$) (GALO et al., 2018).

Uma hipótese para explicar essas baixas taxas de fertilização pode ser a constatação de algumas alterações morfológicas da célula espermática que acabam por prejudicar a motilidade dos espermatozoides.

Tabela 5 - Porcentagem média das fertilizações do sêmen de Piracanjuba criopreservado nas soluções controle, 1mM de melatonina (M1) e 2mM de melatonina (M2), nos diferentes tempos de armazenamento (T1: 15 minutos, T2: 12 horas e T3: 24 horas).

Tratamentos	T1	T2	T3
Controle	1,61±0,25% a	1,06±0,84% a	1,62±0,32% a
M1	5,78± 1,21% b	5,74±2,14% b	5,12±1,65% b
M2	6,16±1,87% b	8,40±2,54% b	3,94±1,12% b

*Os resultados são expressos como média±desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de melatonina na concentração de 2 mM, associada ao crioprotetor metilglicol na solução de criocongelamento, melhora a qualidade espermática e que os tempos de congelamento testados não influenciam na qualidade do sêmen descongelado.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à FAPEMIG, à FUNDECC, à CEMIG e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I., effects of pH and temperature: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.
- ANDRADE, E. S. et al. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, p. 195-201, 2015.
- 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.
- ATENCIO-GARCÍA, V. et al. Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 19, n. 2, p. 87-94, jul./dic. 2017.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2005.
- BLOOM, E. A one minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 1, n. 2, p. 176-177, 1950.
- BUCAK, M. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 67, n. 5, p. 1060-1067, 2007.
- CABRITA, E. et al. Factors affecting sperm quality and emerging tools for sperm analysis. In: FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, 2013, Ghent. **Proceedings...** Ghent, 2013. p. 58-59.
- CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.
- CHAPMAN, B. B. et al. Partial migration in fishes: causes and consequences. **Journal of Fish Biology**, London, v. 81, n. 2, p. 456-478, 2012.
- CHRISTEN, R.; SCHACKMANN, R.; SHAPIRO, B. M. Metabolism of sea urchin sperm: interrelationships between intracellular pH, ATPase activity and mitochondrial respiration. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, p. 258-5392, 1983.
- COSSON, J. et al. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Paris: Cache River, 1999. p. 161-186.
- DU, C. et al. Goswami Mitochondrial ROS and radiation induced transformation in mouse embryonic fibroblasts. **Cancer Biology & Therapy**, London, v. 8, p. 1962-1971, 2009.
- 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, p. 259-263, 2010.

FELIZARDO, V. O. et al. Optimization of artificial propagation in piracanjuba fish *brycon orbignyanus* using cryopreserved semen. **Cryoletters**, Lewes, v. 37, n. 5, p. 330-334, Sept. 2016.

FELIZARDO, V. O. et al. Osmolaridade dos ativadores e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, p. 1255-1262, 2011.

FIDALGO-GUERREIRO, V. H.; FERREIRA, G. C. S. Mitigação de impactos à ictiofauna após barramentos de corpos d'água através de medidas socioeducativas e educação ambiental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO, 1., 2011, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2011. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/wp-content/uploads/sites/30/2016/06/poster.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GALO, J. M. et al. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, Aug. 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjb/2018nahead/1519-6984-bjb-1519-6984182391.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GALO, J. M. et al. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 3, p. 693-699, 2011.

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.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agopecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, 2000.

LAHNSTEINER, F. et al. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 167-179, 1996.

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, July 2013.

LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelamento seminal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 29-34, jan./mar. 2016.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF: MMA, 2008. 2 v. (Biodiversidade, 19).

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 4, p. 298-306, 2006.

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

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.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. 69 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2004.

MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

OLIVEIRA, J. D. et al. Indução a reprodução artificial e caracterização espermática da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Bryconidae, Characiformes), espécie em perigo de extinção. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, Rio Paranaíba, v. 5, n. 2, p. 10-19, ago./dez. 2014.

ORFÃO, L. H. Indução da desova e espermição de peixes em criações comerciais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 192-195, abr./jun. 2013.

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**, London, v. 2013, p. 1-10, Nov. 2013.

PINEDA-SANTIS, H. et al. Semen cryoconservation and sperm quality regarding the neotropical fish *Brycon henni* (Pisces: Characidae). **Orinoquia**, Villavicencio, v. 19, n. 2, p. 166-173, 2015.

SALMITO-VANDERLEY, C. S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelamento e uso de antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p. 194-199, out./dez. 2016.

SANCHES, E. G.; TOSTA, G. A. M.; SOUZA-FILHO, J. J. Viabilidade econômica da produção de formas jovens de bijupirá (*Rachycentron canadum*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, p. 15-26, 2013.

SHIMODA, E. et al. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, n. 54, p. 430-433, 2007.

SOUZA, E. Z. et al. O desenvolvimento embrionário da Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), utilizando técnicas de histologia, microscopia eletrônica de varredura e imunológicas empregando marcadores ósseos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 92-98, dez. 2014. Suplemento 1.

SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 7, p. 657-664, 2016.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008.

VARELA JUNIOR, A. S. et al. Compared methods of cryopreservation of tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 71-77, 2015.

VERMEIRSSSEN, E. L. M. et al. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin releasing hormone agonist implant. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 230, n. 3, p. 547-567, 2003.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Fresh, equilibrated and post-thaw sperm quality of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) treated with either salmon GnRH α and domperidone or pituitary extract. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 13, n. 1, p. 157-164, Jan./Mar. 2015.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 858-865, 2011.

WIRTZ, S.; STEINMANN, P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, p. 1896-1902, 2006.

ARTIGO 2**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DE PIRACANJUBA SUBMETIDO A
DUAS CURVAS DE CONGELAMENTO EM SOLUÇÕES COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA**

Artigo segue as normas e formato da UFLA

*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

Avaliação da qualidade do sêmen de piracanjuba submetido a duas curvas de congelamento em soluções com diferentes concentrações de melatonina

[Evaluation of the quality of the semen of piracanjuba subjected to two freezing curves in solutions with different concentrations of melatonin]

Priscila C. Palhares¹; Isadora de L. Assis², Gilmara Junqueira Machado²; Renata Maria Freitas³; Mariella Bontempo Duca de Freitas³; Daniella Aparecida de Jesus Paula²; Willian Franco Carneiro², Naiara Motta²; Luis David Solis Murgas^{a*}.

¹Departamento Acadêmico de Zootecnia, Instituto Federal de Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, MG, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

³Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

*E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

RESUMO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849) é uma espécie de peixe reofílica de grande interesse para as instituições de pesquisa, porém, atualmente, está categorizada como em perigo de extinção pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. A criopreservação de sêmen é uma técnica que permite o armazenamento dos gametas em longo prazo. Porém, essa biotecnologia pode causar injúria celular e molecular. A adição de antioxidantes à solução de criocongelamento protege os espermatozoides contra os danos causados por radicais livres. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a ação da melatonina e o uso de duas curvas de congelamento sobre os parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado de piracanjuba. Utilizou-se o sêmen de 16 machos adultos e ovócitos de cinco fêmeas de *B. orbignyanus*. Machos e fêmeas foram induzidos hormonalmente com duas doses (0,5 mg e 5,0 mg/kg PV) de extrato hipofisário de carpa. A coleta do sêmen foi realizada por meio de uma leve massagem celomática e as amostras foram coletadas em tubos de vidro graduados. O sêmen *in natura* foi avaliado quanto à taxa de motilidade, ao tempo de motilidade e ao vigor espermático, além de concentração, vitalidade, morfologia, volume, aspecto e cor. Foram utilizadas apenas as amostras de sêmen com motilidade superior a 80%. O sêmen foi diluído na proporção 1:4 (sêmen:diluidor) nos seguintes tratamentos: (T1) 10% metilglicol (MG) + 5% *beltisville thawing solution* (BTS); (T2) 10% metilglicol (MG) + 5% BTS + 2 mM de melatonina. As curvas de congelamento foram T1 (máquina de congelamento automatizada) e T2 (*dry shipper* por 24 horas). Após a realização de cada curva, as palhetas foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento das análises. As amostras foram descongeladas em banho-maria, a 60 °C, por 5 segundos e a motilidade foi mensurada com o auxílio do software *Sperm class analyzer* (SCA). Os parâmetros de motilidade avaliados foram motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média de deslocamento (VAP), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Foram mensurados o tempo de motilidade, a vitalidade, a morfologia, o estresse oxidativo (peroxidação lipídica, atividade das enzimas CAT e SOD, quantificação de óxido nítrico) e as taxas de fertilização e eclosão. Os dados foram analisados utilizando-se o programa R. Para testar a normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks e, em seguida, efetuou-se a análise de variância (*one-way ANOVA*), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey quando constatado efeito significativo ($p < 0,05$). O sêmen *in natura* apresentou motilidade de 98%, duração da motilidade acima de 40 segundos e vigor 5. A concentração espermática foi de $7,37 \pm 3,15 \times 10^9$. Observou-se diferença ($p < 0,05$) entre as soluções nos parâmetros de vitalidade, morfologia, motilidade e taxa de fertilização. As soluções com melatonina apresentaram os melhores valores. Na motilidade, apenas os parâmetros de motilidade total, progressiva e tempo de motilidade apresentaram diferença estatística significativa. No estresse oxidativo, apenas a peroxidação lipídica e a atividade de SOD apresentaram diferença ($p < 0,05$) na interação curva e solução, mostrando as soluções com melatonina com os menores valores. As taxas de fertilização e eclosão também foram maiores para os tratamentos com melatonina, independente da curva. Conclui-se que a adição de melatonina no meio crioprotetor auxilia na manutenção da qualidade seminal e que as curvas estudadas exerceram pouca ou nenhuma influência sobre os mesmos parâmetros.

Palavras-chave: CASA. Qualidade espermática. *Brycon orbignyanus*. Criopreservação. Melatonina. Máquina de congelamento.

ABSTRACT

The piracanjuba (*Brycon orbignyanus Valenciennes, 1849*) is a species of rheophilic fish of great interest by research institutions, but is currently categorized as endangered by the "Red Book of the Brazilian Fauna Threatened with Extinction. Semen cryopreservation is a technique that allows long-term storage of gametes. But this biotechnology can cause cellular and molecular injury. The addition of antioxidants in the cryoclock solution protects the sperm against the damage caused by free radicals. The objective of this work was to evaluate the melatonin action and the use of two freezing curves on the quality parameters of the cryopreserved semen of Piracanjuba. Semen from 16 adult males and oocytes from 5 females of *B. orbignyanus* were used. Males and females were hormonally induced with two doses (0.5mg and 5.0mg / kg PV) of carp pituitary extract. Semen collection was performed through a light celomatous massage and samples collected in graduated glass tubes. The *in natura* semen was evaluated for motility rate, motility time, spermatic vigor concentration, vitality, morphology, volume, appearance and color. Only semen samples with motility greater than 80% were used. The semen was diluted 1: 4 (semen: thinner) in the following treatments: (T1) 10% methylglycol (MG) + 5% *Beltisville Thawing Solution* (BTS); (T2) 10% methylglycol (MG) + 5% *Beltisville Thawing Solution* (BTS) + 2mM melatonin. The freezing curves were: T1 (automated freezing machine) and T2 (nitrogen vapor cylinder, *dry shipper* for 24 hours). After each curve, the vanes were transferred to a liquid nitrogen canister, where they remained until the analysis. Samples were thawed in a 60 ° C water bath for 5 seconds and the motility was measured using the *Sperm Class Analyser* (SCA) software. Motility parameters were: total motility (MT), progressive motility (MP), curvilinear velocity (VCL), straight velocity (VSL), mean velocity of displacement (VAP) and linearity (STR). The time of motility, vitality, morphology, oxidative stress (lipid peroxidation, activity of CAT and SOD enzymes, quantification of nitric oxide) and rates of fertilization and hatching were measured. The data were analyzed using the R program. To test for normality, the Shapiro-Wilks test was used, and *one-way* ANOVA was performed. The averages were compared by the Tukey test when a significant effect was found ($p < 0.05$). The semen *in natura* showed 98% motility, motility duration above 40 seconds and vigor 5. Sperm concentration was $7.37 \pm 3.15 \times 10^9$. It was observed a difference ($p < 0.05$) between the solutions in the parameters of vitality, morphology, motility and fertilization rate. The melatonin solutions had the best values. In motility only the parameters of total, progressive and motile motility that presented significant statistical difference. In oxidative stress, only lipid peroxidation and SOD activity presented a difference ($p < 0.05$) in the curve and solution interaction, showing the melatonin solutions with the lowest values. The rates of fertilization and hatching were also higher for treatments with melatonin independent of the curve. It was concluded that the addition of melatonin in the cryoprotectant medium helps to maintain seminal quality and that the curves studied had little or no influence on the same parameters.

Keywords: CASA. Sperm quality. *Brycon orbignyanus*. Cryopreservation. Melatonin. Freezing machine.

1 INTRODUÇÃO

Nativa da bacia dos rios Paraná e Uruguai, a piracanjuba, como é popularmente conhecida, é uma espécie reofílica e atualmente encontra-se categorizada como em perigo de extinção, pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018). Essa espécie vem apresentando um declínio populacional acentuado, sendo considerada extinta em quase toda a extensão da sua bacia de origem. As causas desse declínio são, principalmente, a sobrepesca, o desmatamento, a poluição, a mudança no regime hidrobiológico, a introdução de espécies exóticas e a fragmentação ambiental. Uma importante causa da redução populacional dessa espécie é a construção de barragens nos rios, pois essa redução de corpos d'água por represamento retarda o período reprodutivo dos peixes (FIDALGO-GUERREIRO; FERREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Uma excelente estratégia de conservação para atenuar o declínio dessas populações de peixes migratórios é a criação de bancos de germoplasma animal, por meio do criocongelamento de sêmen dessas espécies ameaçadas ou em extinção para posterior disponibilização desse material. A criopreservação de sêmen, apesar de ser uma biotecnologia que permite o armazenamento dos gametas em longo prazo, é um processo que pode gerar cerca de 50% de dano nas células, devido ao congelamento e ao descongelamento, o que faz com que o sucesso dessa técnica seja parcial (CABRITA et al., 2013; GALO et al., 2011).

Os danos nas células espermáticas podem ocorrer devido à formação de cristais de gelo no interior da célula, por toxicidade da solução utilizada no processo ou, ainda, pela sensibilidade da célula espermática ao estresse oxidativo em decorrência das espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas ERO, quando encontradas em altas concentrações, podem prejudicar a motilidade espermática, devido ao estresse oxidativo (SOUZA et al., 2016).

O plasma seminal pode apresentar enzimas e antioxidantes responsáveis pela remoção dos radicais livres. No entanto, suas quantidades parecem não ser suficientes para a proteção celular (SANCHES et al., 2009). A adição de antioxidantes no meio de congelação protege os espermatozoides contra os danos causados pelos radicais livres. A melatonina é um antioxidante capaz de sequestrar radicais livres altamente reativos, neutralizando o radical hidroxila (OH), considerado como o mais reativo em sistemas biológicos, com maior eficiência que a glutathione reduzida (antioxidante endógeno) e o manitol (antioxidante observado em plantas) (LOPES; SALMITO-VANDERLEY; ALMEIDA-MONTEIRO, 2016). No entanto, não foram encontrados, até o momento, estudos nos quais seja relatado o uso de melatonina no

congelamento do sêmen de peixes. Porém, em trabalhos com outras espécies animais tem sido demonstrada bastante eficiência dessa molécula na preservação do sêmen criocongelado (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; GHAZALEH et al., 2015; LI et al., 2012; PERUMAL; VUPRU; KHATE, 2013; SOUZA et al., 2016).

Dessa forma, o objetivo, neste estudo, foi avaliar, após o descongelamento, a ação da melatonina e das curvas de congelamento sobre a qualidade do sêmen de piracanjuba.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da comissão de ética da Universidade Federal de Lavras (processo nº039/13).

2.1 Local e seleção dos reprodutores

Parte do trabalho foi realizada na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), na cidade de Itutinga, MG, no período de dezembro de 2017 a janeiro de 2018, durante o período de piracema. As avaliações de taxa de motilidade subjetiva, tempo de motilidade e vigor no pré-congelamento, além das taxas de fertilização no pré-congelamento e pós-descongelamento, foram realizadas no Laboratório da Cemig. A motilidade objetiva e os parâmetros de velocidade espermática, bem como a duração da motilidade, a morfologia e a vitalidade espermática no pós-descongelamento, foram analisados no Biotério Central e no Laboratório de Fisiologia, ambos no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Departamento de Biologia Animal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Com o auxílio de redes de arrasto, os reprodutores foram capturados em tanques escavados. Foram selecionados, para o experimento, 16 animais machos com peso médio de $1,206 \pm 0,103$ kg e cinco fêmeas com peso médio de $1,942 \pm 0,209$ kg. Os machos selecionados apresentaram pequena liberação de sêmen após leve compressão da cavidade celomática, enquanto as fêmeas apresentaram a cavidade celomática abaulada e papila urogenital edemaciada, sendo ambos considerados aptos para reprodução.

Os animais, após a captura, foram pesados individualmente, marcados e colocados em aquários (1.000 L), com condições de temperatura, aeração e pH adequados até o momento da coleta do sêmen.

2.2 Coleta do sêmen

Os animais foram submetidos a tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), para indução da espermiacção. Foram feitas aplicações de duas doses do hormônio, prévia e definitiva, de 0,5 e 5,0 mg de EBHC kg^{-1} , intramuscular, próximo à nadadeira dorsal, conforme protocolo da Cemig. O intervalo entre as doses aplicadas foi de 12 horas e o tempo entre a última dose e a coleta de sêmen foi de, aproximadamente, 8 horas.

Para a realização da coleta do sêmen, os peixes foram colocados sobre uma superfície plana, com os olhos vendados por um pano úmido. A papila urogenital foi limpa e seca com papel toalha, para evitar a ativação prévia do sêmen por contato com água, fezes ou urina do animal. Após secagem da papila, uma leve massagem na parede celomática, no sentido anteroposterior, foi aplicada, a fim de realizar a extrusão do sêmen. As amostras de sêmen foram coletadas em tubos de ensaio graduados estéreis e mantidas refrigeradas em caixa de isopor contendo gelo em barra, até o momento do congelamento.

Após a coleta, foi mensurado o volume e observada a coloração. O sêmen também foi avaliado quanto à contaminação/ativação prévia por urina, fezes, água ou sangue, por meio da visualização de alíquotas de 10 µL de sêmen de cada macho depositadas em lâmina histológica de vidro e observadas em microscópio óptico de luz, com lente objetiva de 40x. Quando constatada ausência de movimentação dos espermatozoides, o sêmen foi homogeneizado com 40 µl de água do tanque, para avaliação subjetiva da motilidade espermática, da duração da motilidade (uso de cronômetro) e do vigor espermático. Foram descartadas as amostras que apresentaram pré-ativação da motilidade e taxa de motilidade inferior a 80%.

Outra alíquota de 10 µL de sêmen de cada animal foi coletada e diluída em formol citrato (990µl), para a determinação da morfologia espermática. O restante do sêmen foi utilizado na criopreservação.

2.3 Criopreservação do sêmen

A criopreservação foi realizada utilizando-se soluções contendo 10% de metil glicol (Maria et al, 2006), diluídas em 5% de BTS (constituído de 79,90 g de glicose; 12,71 g de citrato de sódio; 2,65 g de EDTA; 2,65 g de bicarbonato de sódio; 1,59 g de cloreto de potássio e 0,50g de sulfato de gentamicina em 1,00 L de água destilada) e adicionadas de concentrações diferentes de melatonina (1 mM e 2 mM), resultando nos seguintes tratamentos:

- a) **Controle:** 5% de BTS + 10% MG;
- b) **M1:** 5% de BTS + 10% MG + 1 mM de melatonina;
- c) **M2:** 5% de BTS + 10% MG + 2 mM de melatonina.

A osmolaridade de todas as soluções foi testada e, quando necessário, foi feito o ajuste da solução.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 (sêmen: meio de congelamento) e envasadas em palhetas de 0,25 ml, identificadas. As palhetas contendo o sêmen diluído foram

acondicionadas em raques de polietileno e congeladas utilizando-se duas diferentes curvas de congelamento, sendo

1. curva lenta (**T1**): utilizando a máquina de congelamento automatizada (TK3000® - TK tecnologia em congelação, Uberaba, Brasil), resfriamento das amostras a 5 °C, na curva de 0,5 °C/min, seguido de uma curva de aceleração constante, na velocidade de 20 °C/min entre +5 °C e -100 °C. Em seguida, as amostras foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido, a -196 °C (Cryometal, modelo DS-18), permanecendo estocadas até o momento das análises;

2. curva rápida (**T2**): resfriamento em um botijão de vapor de nitrogênio líquido, tipo *dry shipper* (DS; Taylor-Wharton, modelo CP 300; -170 °C), à temperatura de, aproximadamente, -170 °C (-35,6 °C/min) (MILIORINI, 2012), onde permaneceram por 24 horas e, em seguida, foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido, a -196 °C (Cryometal, modelo DS-18), permanecendo estocadas até o momento das análises.

Aproximadamente dois meses após o congelamento, foram descongeladas uma palhetapara cada análise. Utilizou-se banho-maria, à temperatura de 60 °C, para o descongelamento, sendo as palhetas imersas e levemente agitadas por oito segundos (MURGAS et al., 2004). Em seguida, alíquotas foram separadas para posterior análises de vitalidade (6 µL), motilidade total e tempo de motilidade (10 µL), morfologia (10 µL) e estresse oxidativo (0,5 mL).

2.4 Avaliação da toxicidade das diferentes soluções crioprotetoras antes do congelamento do sêmen

A osmolaridade de todas as soluções foi testada utilizando-se osmômetro digital de refrigeração PZL – 1000 (PZL, Brasil), sendo ajustado quando necessário.

Para testar a toxicidade da solução, foi colocada uma alíquota de sêmen (10 µL) sob uma lâmina histológica de vidro, seguida da adição de uma alíquota da solução crioprotetora (10 µL). Em seguida, observou-se, em microscópio ótico, a presença/ausência de motilidade. Constatando-se que a solução não foi capaz de ativar os espermatozoides, prosseguiu-se adicionando-se uma alíquota da água do tanque (10 µL) e, novamente, observou-se a motilidade espermática, para a confirmação de que a solução crioprotetora não foi capaz de ativar os espermatozoides.

2.5 Avaliação das características seminais

As amostras do sêmen *in natura* foram avaliadas assim que foram coletadas. O volume de sêmen foi mensurado com o auxílio de tubos de ensaio de vidro graduados, bem como a cor e o aspecto foram avaliados por meio da observação direta do sêmen nos tubos.

Para o vigor foram atribuídos valores de 0 a 5 pontos, em função da movimentação dos espermatozoides (STREIT JUNIOR et al., 2009).

A concentração espermática foi mensurada de forma individual a partir do sêmen proveniente de cada reprodutor, utilizando-se os métodos de contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer, espermatozoides. mL⁻¹ (WIRTZ; STEINMANN, 2006).

A motilidade foi estimada subjetivamente por uma mesma pessoa, em microscópio óptico, em porcentagem média de células móveis em três campos, e em escala de 0 a 100%. A ativação do sêmen foi realizada homogeneizando-se o sêmen com água do tanque. A duração da motilidade foi determinada com o auxílio de um cronômetro, desde a homogeneização do sêmen com a água do tanque até que restassem apenas 10% de espermatozoides móveis.

2.6 Vitalidade espermática

A vitalidade espermática foi analisada pelo método de coloração eosina-nigrosina, adaptado de Bloom (1950), utilizando-se a proporção 1:10:10 (sêmen:eosina:nigrosina). Após a preparação das lâminas, 200 espermatozoides foram analisados em microscópio óptico (100x). A vitalidade foi calculada em porcentagem, sendo considerados mortos os espermatozoides corados em rosa ou vermelho e vivos, os incolores.

2.7 Motilidade espermática

As análises de motilidade pós-descongelamento do sêmen foram realizadas de forma objetiva por meio de um sistema de análise computadorizada, utilizando-se o software SCA® (*Sperm class analyzer*® - SCA, 2005, Microptics, S.L., versão 3.2.0).

Em um tubo tipo eppendorff, contendo 300 µl de água do tanque, foi adicionada uma alíquota de 10 µl de sêmen, e homogeneizou-se. Dessa solução, imediatamente após a ativação, 2 µl foram retirados, colocados em câmara hematimétrica de Mackler (profundidade 10µm) e observados em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Eclipse E200®, Tóquio, Japão), sob aumento de 20X, com filtro amarelo, na posição pH1. O início do processo de análise foi

acionado em, aproximadamente, 10 segundos. Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram: velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade da trajetória média (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), motilidade progressiva (MP) e motilidade espermática total (MT). Os resultados expressaram a média obtida por meio da captura de três campos de imagem com, aproximadamente, 300 espermatozoides/campo.

A duração da motilidade no sêmen descongelado, assim como no sêmen *in natura*, foi mensurada com o auxílio de um cronômetro, iniciando desde a homogeneização do sêmen com a solução ativadora até o momento em que o SCA® acusou 90% de espermatozoides estáticos.

2.8 Morfologia das células espermáticas

A análise morfológica foi realizada a partir de amostras de sêmen *in natura* e descongelada, previamente fixada em solução de formol citrato.

Uma alíquota de 10 µl da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica, corada com rosa de bengala (STREIT JUNIOR et al., 2009) e coberta por lamínula. A análise consistiu na contagem das alterações morfológicas de 200 espermatozoides observados em microscópio óptico com objetiva de 100x, em campos distintos.

Os espermatozoides foram classificados como normais ou apresentavam anormalidades primárias (cauda quebrada, enrolada, corrugada ou degenerada) ou secundárias (cauda dobrada, cabeça livre e cauda livre), conforme Galo et al. (2011).

2.9 Peroxidação lipídica no sêmen

A extensão da peroxidação lipídica (LPO) foi medida de acordo com Buege e Aust (1978), envolvendo a medição do malondialdeído total, que é um produto da peroxidação lipídica. Após descongelamento do sêmen, 200 µL de cada tratamento foram pipetados para eppendorf de 1,5 mL e acrescidos de 400 µL de uma solução de ácido tricloroacético (15%)/ácido tiobarbitúrico (0,375%)/ácido clorídrico (0,25 M), aquecido, por 15 minutos, em banho-maria (90 °C) e resfriado. Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para medir a absorvância, a 540 nm, no leitor de microplacas. A concentração de MDA foi determinada utilizando-se a curva padrão de concentrações conhecidas de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO) (WALLIN et al., 1993). Os resultados foram expressos em µmol/L por mg de proteína.

2.10 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada, segundo Dieterich et al. (2000), em leitor de microplacas ($\lambda = 570\text{nm}$), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido e do peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Após o descongelamento do sêmen, 30 μL de cada tratamento foram pipetados em microplaca e acrescidos de 99 μL de tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 7,0), 6 μL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e 15 μL de pirogalol 1,25 mM. Em seguida, as amostras foram aquecidas, a 37 °C, por 5 minutos e a reação foi paralisada com 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados foram expressos U SOD mg proteína⁻¹.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Aebi (1984), utilizando-se H₂O₂ como substrato. Uma alíquota de 1 mL de H₂O₂ foi adicionada à mistura reacional contendo 10 μL de amostra em 1 mL de tampão fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 7,0). Após adição, a mistura reacional foi monitorizada, a 240 nm, durante 1 minuto, a um intervalo de 30 segundos. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade CAT foi definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mmol de H₂O₂ por 1 minuto. Os resultados foram expressos em U CAT/mg proteína⁻¹.

2.12 Determinação da proteína total

A concentração de proteína total das amostras foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão.

2.13 Óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico (ON) foi determinada utilizando-se o sistema de reagentes Griess (1879) (solução aquosa de 1% de sulfanilamida e 0,1% de naftileno-etileno-diamina em H₃PO₄ (2,5%, JT Baker). Este sistema detecta NO₂⁻ em uma variedade de matrizes biológicas.

A mensuração do ON foi realizada pela determinação da quantidade total de nitritos (NO₂⁻), que são os produtos estáveis do metabolismo do NO no fluido seminal. O reagente de

Griess forma um cromóforo estável com NO_2^- , lido na absorvância de 546 nm. A calibração foi feita com diferentes concentrações de nitrito de sódio dissolvido em NaCl a 0,9%.

Após gerar uma regressão linear com as concentrações dos padrões, utilizou-se a equação gerada ($y=0,002810*x+0,04944$) para calcular a concentração de NO nas amostras testadas. O resultado final foi dado em μM .

2.14 Taxa de fertilização e taxa de eclosão

Após avaliação da qualidade seminal, uma palheta de cada tratamento foi descongelada para a fertilização.

Uma alíquota de 100 μl de sêmen de cada palheta foi utilizada para fertilizar 0,1 g de ovócitos (aproximadamente 130 ovócitos). A fertilização foi iniciada adicionando-se 10 ml de água do tanque ao sêmen, juntamente com o ovócito. Em seguida, os ovos foram transferidos para incubadoras experimentais, confeccionadas de cano de PVC (100 mm de diâmetro) com fundo telado (400 μm), dispostas em aquários (1.000 L) com renovação constante de água e à temperatura de 28 °C a 30°C. Para estimar a taxa de fertilização foram contados todos os ovos de cada incubadora em estereoscópio binocular. A contagem foi realizada em, aproximadamente, oito horas após a fertilização.

A taxa de eclosão foi estimada, após 16 horas depois da fertilização, contando-se todas as larvas presentes na incubadora e calculada levando-se em consideração os ovos viáveis contabilizados na taxa de fertilização.

2.15 Análises estatísticas

O experimento foi realizado em esquema fatorial 3 x 2, sendo cada tratamento composto pela combinação de três soluções crioprotetoras e com duas curvas de congelamento, totalizando seis tratamentos. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, sendo o sêmen de cada reprodutor considerado um bloco e cada bloco uma repetição. Foi utilizado o sêmen de dezesseis reprodutores.

Nas análises de caracterização de sêmen, motilidade, tempo de motilidade, vitalidade, morfologia e taxa de fertilização foi utilizado o programa R. Para as análises de estresse oxidativo foi empregado o programa GraphPad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

A distribuição dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk; em seguida, eles foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA). Quando constatada diferença estatística significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$), foi realizado o teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP).

3 RESULTADOS

3.1 Características seminais

As amostras de sêmen apresentaram coloração esbranquiçada e aspecto leitoso. O volume seminal foi de $9,7 \pm 1,8$ mL. A concentração espermática encontrada foi de $7,37 \pm 2,15 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Todas as amostras de sêmen *in natura* apresentaram motilidade acima de 95%, tempo de ativação médio de $48,11 \pm 1,25$ e vigor 5.

3.2 Vitalidade

Por se tratar de um indicador da integridade de membrana, esta análise torna-se fundamental quando se trata de sêmen congelado.

No presente estudo, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na interação entre as soluções e as curvas (Tabela 1). Nas duas curvas utilizadas, as soluções contendo melatonina apresentaram melhores valores em comparação com a solução sem o antioxidante. Dessa forma, as amostras das soluções contendo melatonina apresentaram um maior número de células com a membrana celular intacta.

Tabela 1 - Resultados médios da vitalidade espermática (%), interação entre as soluções e curvas no sêmen descongelado de *B. orbignyana*.

Tratamentos	Curva lenta (T1)	Curva rápida (T2)
Controle	$78,30 \pm 1,2$ a	$79,41 \pm 6,3$ a
M1	$80,72 \pm 2,6$ b	$82,06 \pm 4,6$ b
M2	$86,34 \pm 1,2$ b	$87,44 \pm 2,3$ b

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as soluções, tendo a solução contendo 2 mM de melatonina se destacado ao apresentar valores iguais ao do sêmen *in natura* (tabela 2), enquanto a solução controle e M1 não diferiram entre si e apresentaram os menores valores.

Tabela 2 - Resultados médios da vitalidade espermática (%) no sêmen fresco e descongelado de *B. orbignyana*.

	In natura	Controle	M1	M2
Média±DP (%) *	94,2±2,4 a	80,3±4,1 b	81,3±3,6 b	87,6±2,7 a

*Os resultados são expressos como média±desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

3.3 Motilidade

De fundamental importância no congelamento, esta análise determina a eficácia da técnica de congelamento, pois avalia um dos critérios mais importantes da qualidade seminal. No presente estudo foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) apenas entre as soluções e para os parâmetros de tempo de motilidade (TM), a motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP) (Tabela 3).

Para os três parâmetros, foi observado que as amostras das soluções contendo melatonina apresentaram os melhores resultados, quando comparadas com as amostras da solução controle. Para a motilidade total e para o tempo de motilidade, é possível observar efeito significativo da melatonina, principalmente da solução contendo maior concentração.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão do tempo de motilidade (TM – segundos), motilidade total (MT - %) e motilidade progressiva (MP - %), do sêmen de piracanjuba descongelado.

Tratamentos	MT*	TM*	MP*
Controle	48,15±3,2 a	35,41±2,6 a	9,08±1,2 a
M1	53,23±2,1 a	42,31±1,4 ab	17,21±2,1 b
M2	67,31±3,8 b	47,26±1,3 b	23,01±4,3 b

* Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2018).

3.4 Morfologia

Para um bom desempenho da capacidade fertilizante do espermatozoide, é importante que estas células se apresentem o mais íntegra possível. Dessa forma, a avaliação da morfologia pode mostrar, na maioria das vezes, justificativas para a redução da motilidade e, por

consequência, o baixo potencial fertilizante. No presente estudo foi possível observar diferença estatística significativa entre as soluções utilizadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias de desvio padrão da porcentagem de alterações espermáticas encontradas no sêmen *in natura* e descongelado de *B. orbignyana*.

Tratamentos	Cabeça	Peça intermediária	Cauda	Totais
In natura	3,21±1,2 a	0,00±0,0 a	13,21±4,2 a	16,42±1,7 a
C	13,63±1,4 b	1,21±0,4 a	56,21±2,1 b	71,05±4,2 c
M1	10,44±2,6 b	0,11±0,03 a	38,41±3,4 c	48,96±2,3 b
M2	4,20±1,6 a	0,21±0,03 a	23,12±1,2 a	27,53±2,7 a

* Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2018).

É possível observar que as amostras da solução contendo maior concentração de melatonina apresentou comportamento similar ao das amostras de sêmen *in natura* para todos os parâmetros. Isso mostra influência positiva desta solução sobre a célula espermática.

As amostras da solução sem adição de melatonina apresentaram os valores mais altos para todos os parâmetros, sendo as que apresentaram mais alterações na célula espermática (71,05%). Em contrapartida, dentre as soluções avaliadas, as amostras da solução com maior concentração de melatonina apresentaram os menores valores, encontrando-se próximos aos valores do sêmen *in natura*.

Na interação ($p < 0,05$) entre as soluções e as curvas para o total de alterações nas células espermáticas, as amostras controle da curva rápida (T2) apresentaram o maior número de alterações (78,2±3,5%). Os menores valores foram observados nas amostras das soluções contendo melatonina, independente da curva utilizada. Porém, as amostras da solução M2 na curva T1 se destacaram com o menor valor (20,76±2,9%), se diferenciando significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos.

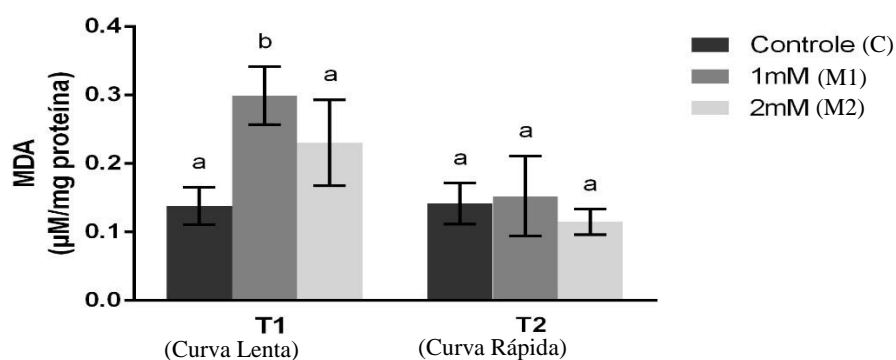
3.5 Estresse oxidativo

Nos resultados da peroxidação lipídica (MDA), a interação entre as soluções e as curvas de congelamento foi observada (Figura 1).

As amostras das soluções controle (C) e M2 proporcionaram os menores valores de peroxidação lipídica ($p < 0,001$) quando congeladas utilizando a curva de congelamento T1. No entanto, as amostras da solução M1 apresentaram valores de peroxidação lipídica maiores.

Na curva de congelamento T2 não foi observada diferença ($p < 0,001$) entre os valores de peroxidação lipídica, nas amostras diluídas nas diferentes soluções.

Figura 1 - Peroxidação lipídica (MDA), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyianus* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média \pm desvio padrão. Significância estatística $p < 0,001$. $n = 16$. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2).

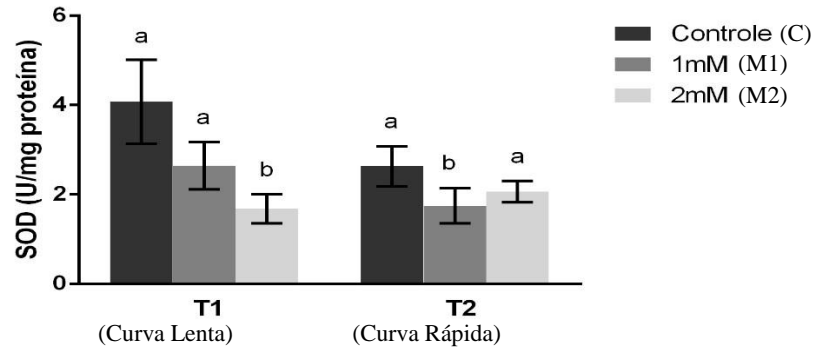


Fonte: Da autora (2018).

Na Figura 2 é possível observar a atividade da superóxido dismutase (SOD) nas diferentes soluções e curvas.

Observou-se interação ($p < 0,001$) entre solução e curva de congelamento, na atividade da SOD das amostras descongeladas. Na curva lenta (T1), observou-se que as amostras congeladas em soluções contendo melatonina apresentaram atividade de SOD inferior ($p < 0,001$) àquelas observadas nas amostras congeladas em solução controle. Entretanto, a solução M2 apresentou os menores valores.

Figura 2 - Atividade de superóxido dismutase (SOD), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyana* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística $p<0,001$. $n=16$. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2).

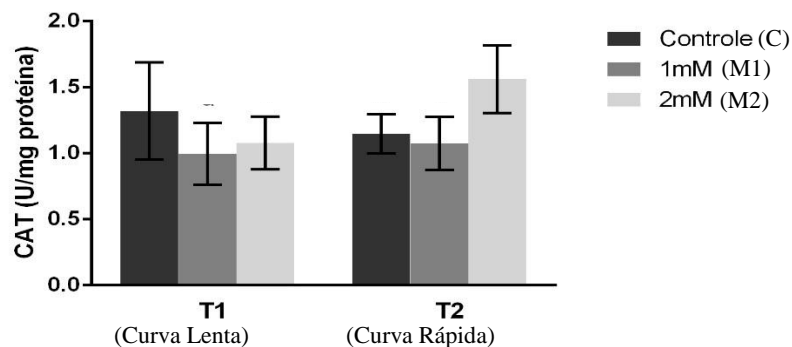


Fonte: Da autora (2018).

É possível observar o mesmo comportamento das soluções no congelamento T2, no qual as soluções contendo melatonina apresentaram os menores valores para a atividade de SOD ($p<0,001$), quando comparadas com a solução controle. Porém, a solução que apresentou os valores mais baixos, neste caso, foram as amostras congeladas na solução M1.

Em relação à atividade da catalase (CAT), não houve interação ($P>0,001$) entre as soluções e as curvas de congelamento (Figura 3). Não foi observada diferença estatística significativa ($P>0,001$) entre os valores da atividade de CAT nas amostras diluídas nas diferentes soluções e congeladas nas duas curvas.

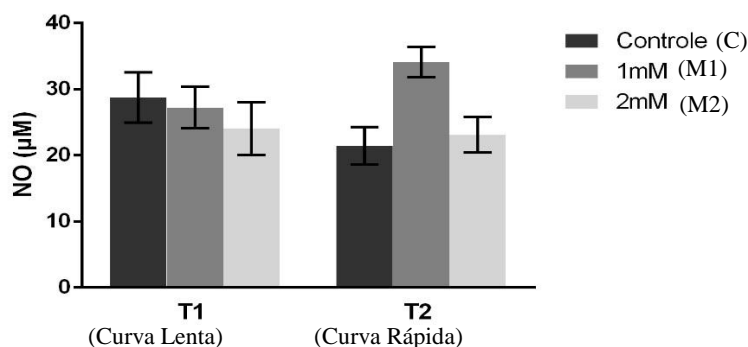
Figura 3 - Atividade da catalase (CAT), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyana* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística $p<0,001$. $n=16$. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2).



Fonte: Da autora (2018).

Na quantificação do óxido nítrico (ON), não houve interação ($P>0,001$) entre as soluções e as curvas de congelamento (Figura 4).

Figura 4 - Quantificação de óxido nítrico (ON), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *B. orbignyianus* congeladas em diferentes curvas em meios contendo melatonina. Valores são dados em média±desvio padrão. Significância estatística $p<0,001$. $n=16$. Legenda: T1: curva lenta; T2: curva rápida; Controle (solução C); 1mM (solução M1); 2mM (solução M2).



Fonte: Da autora (2018).

Não se observou diferença estatística significativa ($P>0,001$) entre os valores de ON nas amostras congeladas nas diferentes soluções e curvas.

3.6 Taxa de fertilização e taxa de eclosão

Observou-se diferença estatística significativa ($p<0,05$) da taxa de fertilização e eclosão entre as soluções, em que as soluções contendo melatonina apresentaram as maiores taxas quando comparadas à solução controle (tabela 5). Ainda foi possível observar que, entre as soluções que contêm melatonina, a solução M2 apresentou taxa de eclosão similar à do sêmen *in natura*.

Tabela 5 - Médias e desvio padrão das taxas de fertilização e eclosão das amostras de sêmen de piracanjuba *in natura* e descongeladas.

Tratamentos	Taxa de fertilização	Taxa de eclosão
<i>In natura</i>	92,18±2,9 a	91,34±4,2 a
Controle	13,21±2,4 c	56,10±2,6 c
M1	29,71±1,6 b	83,53±6,8 b
M2	38,03±3,1 b	92,18±4,1 a

*Os resultados são expressos como média±desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p\leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

Na Tabela 6 pode-se observar a interação entre as soluções e as curvas. Para a taxa de fertilização, as soluções contendo melatonina apresentaram os maiores valores, diferindo, estatisticamente ($p < 0,05$), das soluções controles nas duas curvas. No entanto, a solução M2 se destacou, apresentando taxas próximas de 40%.

Tabela 6 - Resultados das taxas de fertilização e eclosão na interação solução e curvas de congelamento no sêmen descongelado de *B. orbignyana*.

Tratamentos	Taxa de fertilização	Taxa de eclosão
CT1	11,07±1,2 c	93,08±6,5 a
CT2	13,04±1,5 c	57,53±2,6 b
M1T1	26,15±3,5 b	98,23±8,2 a
M1T2	30,21±2,1 b	96,99±4,3 a
M2T1	39,02±6,4 a	99,24±9,7 a
M2T2	37,77±4,9 a	96,99±3,8 a

*Os resultados são expressos como média±desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2018).

Quanto à taxa de eclosão, os tratamentos apresentaram comportamento similar, exceto a solução controle na curva do *dry shyper*, que apresentou a menor taxa.

4 DISCUSSÃO

As características seminais gerais entre os peixes teleósteos apresentam grande variabilidade individual, pois a interação de fatores ambientais, genéticos e fisiológicos associados à adaptação necessária de cada espécie, poderá influenciar esses parâmetros. A descrição da cor e do aspecto do sêmen encontrada neste estudo condiz com o encontrado por Oliveira et al. (2014), que observaram coloração esbranquiçada e aspecto leitoso do sêmen de *B. orbignyanus*. Já o valor do tempo de ativação dos espermatozoides, encontrado pelos mesmos autores, foi superior ao encontrado neste estudo ($54,08 \pm 2,52$ e $46,11 \pm 1,25$, respectivamente). Porém, o volume ($5,43 \pm 0,73$ mL), a motilidade total ($78,03 \pm 2,84\%$) e a concentração espermática ($1,83 \pm 0,31 \times 10^7$) observados por Oliveira foram inferiores aos encontrados neste trabalho, o que pode estar associado ao fato de o estudo daqueles autores ter sido desenvolvido sem a indução hormonal dos machos. No entanto, trabalhando com o mesmo gênero, mas espécie diferente, Atencio-Garcia et al. (2017) observaram, em *B. moorei*, volume ($3,5 \pm 1,8$ mL), motilidade total ($84,0 \pm 3,2$) e tempo de ativação ($33,7 \pm 3,3$) inferiores aos encontrados neste estudo. Apenas a concentração ($12,39 \pm 1,4 \times 10^9$ spz/mL) se mostrou superior, mas isso pode ser justificado por se tratar de espécie diferente.

A concentração espermática é um parâmetro muito importante na avaliação da qualidade do sêmen coletado, pois o conhecimento desses valores pode otimizar a utilização do sêmen no processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005). Neste estudo os dados obtidos para concentração foram superiores aos encontrados por Mojica (2004) ($2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$ spz/ml). A concentração espermática observada por Maria et al. (2006) e Murgas et al. (2004) foi de $8,21 \pm 2,26 \times 10^9$ spz/mL e $5,88 \times 10^9$ spz/ml, respectivamente. Ambos estudaram a mesma espécie, *B. orbignyanus*, induzida hormonalmente, corroborando os valores encontrados no presente trabalho. Valores bastante superiores ($18,31 \pm 3,33 \times 10^9$ spz/ml) foram encontrados por Oliveira et al. (2014), trabalhando com a mesma espécie.

O vigor espermático é um parâmetro que está altamente relacionado com a motilidade espermática (GALO et al., 2011). A queda de ambos ocorre concomitantemente e as perdas na qualidade dos espermatozoides variam de acordo com as espécies nativas (MARQUES; GODINHO, 2004). Valores inferiores aos encontrados no presente trabalho foram observados por Garcia et al. (2016), trabalhando com *Colossoma macropomum* ($3,5 \pm 1,1$) e por Galo et al. (2018), em *B. orbignyanus* ($4,83 \pm 0,42$). No entanto, o valor encontrado pelo segundo autor corrobora o deste trabalho.

A criopreservação é uma biotecnologia que visa à preservação da célula por longos períodos de tempo. Mas, para que se obtenha sucesso nessa prática, é importante utilizar meios de congelamento adequados, bem como curvas de congelamento que visem lesionar o mínimo possível a célula, permitindo a manutenção de seu potencial de fertilização. No presente trabalho observou-se que o crioprotetor metilglicol, associado à adição de melatonina, foi eficiente na preservação de alguns parâmetros de qualidade da célula espermática. A solução contendo a maior concentração de melatonina se destacou nos parâmetros de vitalidade, motilidade total, duração da motilidade, motilidade progressiva e morfologia. Sobre esses parâmetros, as temperaturas das curvas utilizadas neste trabalho não influenciaram a qualidade do sêmen descongelado. Somente a solução M2 na curva utilizando a máquina de congelamento apresentou, na morfologia espermática, o menor número de células com alterações.

A vitalidade espermática é um indicador da integridade de membrana, sendo, dessa forma, um parâmetro muito importante a ser avaliado quando se trata de protocolos de criocongelamento. No presente estudo, observou-se que as amostras das soluções contendo melatonina apresentaram melhores taxas, tendo as da solução M2 apresentado o maior valor ($87,6 \pm 2,7\%$) em relação à solução controle. Pineda-Santis et al. (2015), trabalhando com sêmen descongelado de *Brycon henni* e sem utilizar antioxidante na solução crioprotetora, encontraram valor ($82,0 \pm 1,9\%$) que corrobora os encontrados neste trabalho. Já Linhares et al. (2017), trabalhando com vitaminas C e E adicionadas ao meio crioprotetor, encontraram, no sêmen descongelado de carpa comum, valores similares ao encontrado neste trabalho ($48,58 \pm 8,12$ e $61,08 \pm 22,50$, respectivamente).

Visando melhorar a qualidade do sêmen após a criopreservação, a adição de antioxidantes aos diluidores de criopreservação vem sendo objeto de estudos por diferenciados grupos de pesquisas em todo o mundo (KUTLUYER et al., 2014; NAVARRO et al., 2014). Em alguns trabalhos foi demonstrado que esses antioxidantes podem apresentar efeitos positivos sobre a redução dos níveis de ROS e sobre a motilidade total, melhorando, conseqüentemente, a duração da motilidade e a redução das anormalidades espermáticas. Contudo, esse efeito positivo depende do tipo e da concentração do antioxidante (CAO; CUTLER, 1997).

A motilidade espermática é o parâmetro responsável pelo potencial de fertilização da célula encontra-se totalmente ameaçado. Juntamente com a motilidade total, têm-se também a duração da motilidade e a motilidade progressiva dessa célula, que mostram a capacidade dessa célula de se locomover em busca do ovócito. Neste trabalho observou-se que todas as soluções apresentaram valores acima de 40% de motilidade total, destacando-se a solução M2, que apresentou $67,31 \pm 3,8\%$. A duração da motilidade, bem como a motilidade progressiva,

também foram maiores nas amostras das soluções contendo melatonina, quando comparadas com a solução controle. Trabalhando com sêmen de carpa comum criopreservado em solução contendo antioxidante, Linhares et al. (2017) encontraram valores diferentes dos encontrados neste trabalho para a motilidade total dos espermatozoides descongelados (entre $28,87 \pm 7,44$ e $46,04 \pm 9,94\%$). No entanto, encontraram valores similares para a duração da motilidade (entre $50,67 \pm 20,22$ e $70,54 \pm 11,50$ segundos).

A avaliação da morfologia da célula espermática está altamente relacionada com o potencial fertilizante dos espermatozoides, pois a integridade das estruturas da célula é imprescindível para o bom desempenho dessa função. Dessa forma, na maioria das vezes, poderá explicar a redução da motilidade do espermatozoide e, por consequência, a perda da capacidade fertilizante dos ovócitos (STREIT JUNIOR et al., 2008). Neste estudo foi possível observar que a solução que não tinha adição de melatonina (controle) apresentou os maiores valores de alterações totais (71%) e, conseqüentemente, os maiores valores para as alterações de cabeça, peça intermediária e cauda também foram observados nessas amostras (16,6%, 1,2% e 56,2%, respectivamente). Em contrapartida, as amostras da solução M2 apresentaram valores próximos aos encontrados no sêmen *in natura*, mostrando que tal solução foi capaz de preservar melhor as células espermáticas, quando comparada às demais soluções. As amostras da curva utilizando a máquina de congelamento associada à solução contendo 2 mM de melatonina foram as que menos apresentaram alterações, tendo as alterações totais sido inferiores a 21%. Pode-se sugerir que o antioxidante utilizado neste trabalho apresentou influência na preservação das células espermáticas, visto que Linhares et al. (2015) encontraram, no sêmen de carpa comum criopreservado em solução contendo antioxidante, valores de células normais que corroboram os encontrados aqui (entre $49,50 \pm 7,48$ e $57,17 \pm 14,85\%$). Tem-se, ainda, que Miliorini (2012) afirma 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*.

No entanto, o processo de criopreservação pode causar a excessiva produção de algumas substâncias capazes de causar sérios danos à célula. Essas substâncias são conhecidas como espécies reativas ao oxigênio (ERO) e causam estresse oxidativo na célula, sendo um dos principais fatores da queda da qualidade espermática. A membrana plasmática das células espermáticas apresenta alta concentração de ácidos graxos insaturados, o que as torna bastante susceptíveis à peroxidação lipídica (HAGEDORN et al., 2012; JONES; HAMILTON; FAWCETT, 1979). Quando ocorre a peroxidação lipídica, a membrana plasmática da célula

perde a fluidez necessária para os eventos de fusão de membranas associadas à posterior fecundação e integridade de membrana (HAGEDORN et al., 2012; STOREY, 1997).

No presente trabalho, na curva T1, as soluções contendo melatonina apresentaram maiores valores de peroxidação lipídica ($M1= 0,29\pm0,04$; $M2=0,14\pm0,03$). Porém, só se observou diferença estatística significativa na solução M1 da mesma curva, quando avaliada a interação entre as soluções e as curvas. Quando as EROs afetam a membrana das mitocôndrias, observa-se o reflexo na motilidade espermática, visto que irá afetar o fornecimento de energia para a movimentação do flagelo (CABRITA et al., 2014). Sendo assim, pode-se sugerir que parte da peroxidação lipídica observada neste estudo para a solução M1 na curva T1 pode ter ocorrido devido a lesões na membrana mitocondrial, visto que a motilidade das amostras desse tratamento foi baixa.

Corroborando este resultado, Liu et al. (2015) observaram redução da motilidade espermática associada com a redução da função mitocondrial, em sêmen descongelado de *Pargus major* criopreservado em solução contendo antioxidante. Nesta mesma espécie, mas avaliando o tempo de armazenamento, Chen et al. (2010) também constataram a baixa da motilidade espermática correlacionada com a alta peroxidação lipídica. Hagedorn et al. (2012), avaliando o estresse oxidativo do sêmen de *zebra fish*, observaram a mesma correlação da baixa motilidade e alta peroxidação lipídica. Já em jundiá, Costa (2018) encontrou valores próximos ao menor valor ($M1T2=0,082\pm0,00$) encontrado no presente estudo, adicionando cisteína e glutamina no meio de criocongelamento do sêmen. Este autor encontrou valores entre $0,063\pm0,01$ e $0,078\pm0,00$.

O estresse oxidativo pode ser mensurado por meio da quantificação de óxido nítrico presente, além da atividade de enzimas como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A SOD é uma enzima que atua na remoção do radical superóxido (O_2^-) e o converte em oxigênio e em peróxido de hidrogênio. Foi observada, no sêmen descongelado de *B. orbignyianus*, baixa atividade dessa enzima (entre $1,39\pm0,16$ e $3,25\pm0,49$) nas amostras com alta motilidade espermática (acima de 50%), ou seja, nas amostras congeladas utilizando soluções contendo melatonina, em ambas as curvas. Possivelmente, essas soluções foram capazes de prevenir a formação dessa espécie reativa de oxigênio durante o processo de congelamento e descongelamento, repercutindo numa menor produção do O_2^- e, conseqüentemente, uma menor conversão desses radicais em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Costa (2018) encontrou valores bastante superiores trabalhando com outro antioxidante no sêmen de *Rhamdia quelen* ($53,53\pm2,80$ e $262,2\pm3,5$).

A atividade de CAT foi baixa em todos os tratamentos (entre $0,79\pm 0,12$ e $1,56\pm 0,25$), apresentando apenas uma diferença não significativa nas soluções controle e M2 da curva T2 ($1,14\pm 0,14$ e $1,56\pm 0,25$, respectivamente), que apresentaram os maiores valores. A enzima CAT é responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 . O peróxido de hidrogênio pode ser altamente tóxico para a célula, pois atravessa com facilidade a membrana celular e forma radicais de hidrogênio (OH^\cdot) que podem causar sérios danos no DNA e perda do potencial fertilizante dos espermatozoides (BORGES et al., 2011). Em jundiá, Costa (2018) encontrou valores entre $8,78\pm 0,95$ e $26,29\pm 3,22$, quando trabalhou com cisteína e glutamina na solução de criocongelamento.

Na quantificação do óxido nítrico (ON), o tratamento M1T2 apresentou o maior valor ($34,11\pm 2,30$), no entanto, não foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Esse radical livre, em grandes concentrações, pode causar injúrias oxidativas nas membranas lipídicas e nas proteínas transmembrana, podendo danificar também ácidos nucleicos (CARVALHO et al., 2001).

As melhores taxas de fertilização, no presente estudo, foram observadas nas amostras congeladas em solução contendo melatonina na curva T2. As taxas de eclosão desses tratamentos foram similares às taxas para o sêmen *in natura*. Isso se justifica devido ao fato de estes tratamentos também apresentarem bons valores de motilidade e boas taxas de vitalidade. O que pode ter impedido que a taxa de fertilização fosse maior, provavelmente, foram o número de anormalidades na célula espermática e o estresse oxidativo, principalmente na solução M1.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a adição de melatonina associada ao crioprotetor metilglicol mantém a qualidade do sêmen descongelado de *B. orbignyana* e que as curvas estudadas exerceram pouca ou nenhuma influência sobre os mesmos parâmetros. Dentre as soluções contendo melatonina, a solução cuja concentração foi de 2 mM foi mais benéfica no criocongelamento das células espermáticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à FAPEMIG, à FUNDECC, à Cemig e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, New York, n. 105, p. 121-126, 1984.
- 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, n. 139, p. 25-30, 2013.
- ATENCIO-GARCÍA, V. et al. Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 19, n. 2, p. 87-94, jul./dic. 2017.
- BLOOM, E. A one minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 1, n. 2, p. 176-177, 1950.
- BORGES, J. C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CABRITA, E. et al. Factors affecting sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Berlin, v. 78, n. 4, p. 58-59, 2013.
- CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 432, p. 389-401, 2014.
- CAO, G.; CUTLER, R. G. High concentration of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Amsterdam, v. 17, p. 189-201, 1997.
- CARVALHO et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2001.
- CHEN, Y. K. et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 2, p. 189-193, 2010.
- COSTA, B. B. **Effect of the addition of antioxidants cistein and glutamine to the cryoprotectant solution of jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2018. 68 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart : increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, Baltimore, n. 101, p. 33-39, 2000.

FIDALGO-GUERREIRO, V. H.; FERREIRA, G. C. S. Mitigação de impactos à ictiofauna após barramentos de corpos d'água através de medidas socioeducativas e educação ambiental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO, 1., 2011, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2011. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/wp-content/uploads/sites/30/2016/06/poster.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GARCIA, R. R. F. et al. Different extenders solutions for tambaqui semen cooling. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 51, n. 6, p. 780-784, jun. 2016.

GALO, J. M. et al. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 3, p. 693-699, ago. 2011.

GALO, J. M. et al. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, Aug. 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjb/2018nahead/1519-6984-bjb-1519-6984182391.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GHAZALEH, I. et al. Melatonin has a beneficial effect on stallion sperm quality in cool condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 35, p. 555-559, 2015.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen". **Chemische Berichte**, Weinheim, v. 12, p. 426-428, 1879.

HAGEDORN, M. et al. Oxidative stress in Zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2018) **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**: Volume I/1. ed. Brasília: ICMBio, 492 p. (impresso). Acompanha Pen Card contendo: v.2. Mamíferos - v.3. Aves - v.4. Répteis - v.5. Anfíbios - v.6. Peixes - v.7 Invertebrados.

JONES, R.; HAMILTON, D. W.; FAWCETT, D. W. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 156, n. 3, p. 373-400, 1979.

KUTLUYER, F. et al. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, San Diego, v. 69, p. 462-466, 2014.

LI, X. X. et al. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 47, p. 299-307, 2012.

LINHARES, F. R. A. et al. Cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum criopreservados em água de coco em pó ACP-104. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, p. 1313-1320, 2015.

- LINHARES, F. R. A. et al. Efeito de vitaminas adicionadas ao diluente ACP-104 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carpa comum - *Cyprinus carpio*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 4, p. 980-988, jul./ago. 2017.
- LIU, Q. et al. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 413-422, 2015.
- LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelação seminal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 29-34, jan./mar. 2016.
- LOWRY, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n. 193, p. 265-275, 1951.
- MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, p. 298-306, 2006.
- 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, p. 799-804, 2004.
- MILIORINI, A. B. **Resfriamento e congelamento de embriões de dourado (*Salminus brasiliensis*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piapara (*Leporinus obtusidens*)**. 2012. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. 82 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, dez. 2004.
- NAVARRO, R. D. et al. Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. **Acta Scientiarum: Technology**, Maringá, v. 36, p. 55-60, 2014.
- OLIVEIRA, D. J. et al. Indução a reprodução artificial e caracterização espermática da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Bryconidae, Characiformes), espécie em perigo de extinção. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, Rio Paranaíba, v. 5, n. 2, p. 10-19, ago./dez. 2014.
- 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**, London, v. 2013, p. 1-10, 2013.

PINEDA-SANTIS, H. et al. Semen cryoconservation and sperm quality regarding the neotropical fish *Brycon henni* (Pisces: Characidae). **Orinoquia**, Villavicencio, v. 19, n. 2, p. 166-173, 2015.

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

SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 7, p. 657-664, jul. 2016.

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, p. 203-213, 1997.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 35, p. 159-167, 2009.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008.

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, Edinburgh, v. 73, p. 1N-9N, 2005.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 208, p. 10-15, 1993.

WIRTZ, S.; STEINMANN, P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, p. 1896-1902, 2006.