



PEDRO ANTÔNIO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DA *Arthrospira platensis* NO
CONGELAMENTO DE SÊMEN DE *Piaractus mesopotamicus***

**LAVRAS – MG
2024**

PEDRO ANTÔNIO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DA *Arthrospira platensis* NO CONGELAMENTO DE
SÊMEN DE *Piaractus mesopotamicus***

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

Prof^o. Dr^o. Luis David Solis Murgas
Orientador

Prof^a Dr^a Daniella Aparecida de Jesus Paula
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2024**

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

Oliveira, Pedro Antônio de.

Efeitos da utilização da *Arthrospira platensis* no congelamento
de sêmen de *Piaractus mesopotamicus* / Pedro Antônio de Oliveira.
- 2024.

47 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Daniella Aparecida de Jesus Paula.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Piscicultura. 2. Pacu. 3. Criopreservação. I. Murgas, Luis
David Solis. II. Paula, Daniella Aparecida de Jesus. III. Título.

PEDRO ANTÔNIO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DA *Arthrospira platensis* NO CONGELAMENTO DE
SÊMEN DE *Piaractus mesopotamicus***

**EFFECTS OF THE USE OF *Arthrospira platensis* ON FREEZING SEMEN OF
*Piaractus mesopotamicus***

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

APROVADO em 06 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas.....UFLA

Prof.(a) Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula.....UFPI

Prof.(a) Dra. Priscilla Cotta Palhares.....IFSUDESTE/MG

Prof^o. Dr^o. Luis David Solis Murgas
Orientador

Prof^a Dr^a Daniella Aparecida de Jesus Paula
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por toda as bênçãos em minha vida e à minha família, pois foi devido ao apoio deles, que sempre me incentivaram, que foi possível trilhar por esse caminho.

Agradeço ao meu orientador professor Luis David Solis Murgas que foi o maior responsável por eu conhecer o caminho da pós-graduação e através de sua orientação que eu me tornasse um profissional melhor.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras por me acolher desde a graduação até a pós-graduação e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por ter possibilitado tanto meu engrandecimento acadêmico, como crescimento pessoal.

Agradeço também aos meus colegas do Biotério Central-UFLA, principalmente os representantes do núcleo de estudos em fisiologia de peixes de água doce, por todo conhecimento compartilhado.

Agradecimento em especial a Daniella, Janina, Isabela, Naiara, Kiara e Vinícius por estarem presentes ao longo dessa jornada, me aconselhando e me auxiliando durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a todo apoio fornecido pelo pessoal da Estação de Piscicultura da CEMIG – Itutinga, em especial ao senhor Jaílson e ao Alexandre.

Agradeço aos meus amigos, tanto de Ijaci, quanto de Lavras e à minha namorada Náthaly Honório, por estar sempre ao meu lado com seu amor e companheirismo.

Agradeço por fim, à CAPES, CNPq e ao projeto VALE pelo financiamento das pesquisas.

RESUMO

Piaractus mesopotamicus é um peixe nativo com relevância dentro do cenário da piscicultura brasileira e a criopreservação espermática pode auxiliar a cadeia produtiva através da redução de assincronia gonadal, otimização de doses inseminantes, facilidade de transporte, dentre outras vantagens. E por ser uma técnica que pode causar danos às estruturas dos gametas pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's), é feita a utilização de soluções crioprotetoras para reduzir esses danos, porém, a suplementação com substâncias antioxidantes é uma alternativa para melhorar a eficácia das soluções crioprotetoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação de diferentes concentrações de *Arthrospira platensis* no protocolo de criopreservação espermática de peixes da espécie *P. mesopotamicus*. Foram utilizados 6 machos ($966,66g \pm 179,50$) advindos da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais, localizada de cidade de Itutinga–MG. A coleta do sêmen foi realizada durante o mês de janeiro de 2023 e posteriormente armazenado em botijão de nitrogênio líquido. Além do grupo controle formado por solução crioprotetora à base de DMSO 5% e glicose 4%, foram testados 5 tratamentos onde a solução controle foi suplementada com 2mg, 4mg, 6mg e 8mg de *A. platensis*. Além de, testes envolvendo a atividade enzimática, foram realizadas análises da motilidade espermática do sêmen fresco e pós-descongelamento, integridade de membrana, taxa de fertilização, desenvolvimento larval e realizado o teste de Tukey a 5% de significância. Em relação aos resultados, não houve diferença estatística entre a motilidade subjetiva (100%) e duração da motilidade (38-60s) entre as amostras dos reprodutores. Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle quanto a motilidade geral (34,3-50,80%); motilidade progressiva (4,71-8,65%); VCL (57,66-66,13 $\mu\text{m/s}$); VSL (29,83-35,23 $\mu\text{m/s}$); VAP (44,63-49,29 $\mu\text{m/s}$); BCF (11,37-12,04 Hz). Não houve diferença estatística para as atividades enzimáticas da SOD (61,01-109,58 U-SOD/mg) e GST (254,07-383,41 U-GST/mg) nos diferentes tratamentos. Em relação à CAT houve diferença entre o grupo suplementado com 4mg (3,66 U-CAT/mg) e os grupos suplementados com 2mg (7,48 U-CAT/mg) e 6mg (7,23 U-CAT/mg). Porém, não houve diferença entre o grupo suplementado com 8mg (5,42 U-CAT/mg) e o grupo controle (5,48 U-CAT/mg). Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle para a integridade de membrana (49-63%). Em relação a taxa de fertilização, houve diferença estatística entre o grupo suplementado com 8mg (70,33%) e os grupos suplementados com 2mg (41,13%), 4mg (28,50%) e 6mg (36,50%), porém não houve diferença entre os tratamentos e o grupo controle (51,94%). Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle quanto à morfometria larval: comprimento total (5,61-5,69mm); altura do corpo (0,88-0,95mm); diâmetro ântero-posterior do olho (0,37-0,39mm). Logo, a suplementação com *A. platensis*, nas diferentes concentrações testadas no presente trabalho não foram capazes de influenciar os parâmetros relacionados a motilidade espermática pós-descongelamento do sêmen da espécie *P. mesopotamicus*. E considerando-se os resultados da taxa de fertilização, são necessários mais estudos acerca da utilização da *A. platensis* na suplementação de soluções crioprotetoras, além da necessidade da aplicação de outros testes, como marcadores de estresse oxidativo e análises de integridade de DNA.

Palavras-chave: piscicultura; Pacu; criopreservação.

ABSTRACT

Piaractus mesopotamicus is a native fish with relevance in the Brazilian fish farming scenario and sperm cryopreservation can help the production chain by reducing gonadal asynchrony, optimizing inseminating doses, facilitating transport, among other advantages. As it is a technique that can cause damage to gamete structures through the generation of reactive oxygen species (ROS), cryoprotective solutions are used to reduce this damage, but supplementation with antioxidant substances is an alternative to improve the effectiveness of cryoprotective solutions. The aim of this study was to evaluate the supplementation of different concentrations of *Arthrospira platensis* in the sperm cryopreservation protocol of *P. mesopotamicus* fish. Six males ($966.66\text{g}\pm 179.50$) from the Companhia Energética de Minas Gerais Fish Farm, located in the town of Itutinga-MG, were used. The semen was collected in January 2023 and then stored in a liquid nitrogen canister. In addition to the control group made up of a cryoprotective solution based on DMSO 5% and glucose 4%, 5 treatments were tested in which the control solution was supplemented with 2mg, 4mg, 6mg and 8mg of *A. platensis*. In addition to tests involving enzymatic activity, analyses were carried out on the sperm motility of fresh and post-thawed semen, membrane integrity, fertilization rate, larval development and the Tukey test at 5% significance. As far as the results are concerned, there was no statistical difference between subjective motility (100%) and motility duration (38-60s) between the sire samples. There was no statistical difference between the treatments and the control group in terms of general motility (34.3-50.80%); progressive motility (4.71-8.65%); VCL (57.66-66.13 $\mu\text{m/s}$); VSL (29.83-35.23 $\mu\text{m/s}$); VAP (44.63-49.29 $\mu\text{m/s}$); BCF (11.37-12.04 Hz). There was no statistical difference in the enzymatic activities of SOD (61.01-109.58 U-SOD/mg) and GST (254.07-383.41 U-GST/mg) in the different treatments. With regard to CAT, there was a difference between the group supplemented with 4mg (3.66 U-CAT/mg) and the groups supplemented with 2mg (7.48 U-CAT/mg) and 6mg (7.23 U-CAT/mg). However, there was no difference between the group supplemented with 8mg (5.42 U-CAT/mg) and the control group (5.48 U-CAT/mg). There was no statistical difference between the treatments and the control group for membrane integrity (49-63%). Regarding the fertilization rate, there was a statistical difference between the group supplemented with 8mg (70.33%) and the groups supplemented with 2mg (41.13%), 4mg (28.50%) and 6mg (36.50%), but there was no difference between the treatments and the control group (51.94%). There was no statistical difference between the treatments and the control group in terms of larval morphometry: total length (5.61-5.69mm); body height (0.88-0.95mm); anteroposterior diameter of the eye (0.37-0.39mm). Therefore, supplementation with *A. platensis* at the different concentrations tested in this study was not able to influence the parameters related to post-thaw sperm motility in *P. mesopotamicus* semen. Considering the results of the fertilization rate, more studies are needed on the use of *A. platensis* in the supplementation of cryoprotective solutions, as well as the need to apply other tests, such as oxidative stress markers and DNA integrity analyses.

Keywords: fish farming; Pacu; cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	13
Figura 2 – Mecanismo de produção de ROS, peroxidação lipídica e defesa antioxidante em espermatozoides de peixes	19
Figura 3 – Exemplo de viveiro escavado utilizado na da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG)	26
Figura 4 – Massagem realizada na cavidade celomática em sentido crânio-caudal para coleta de sêmen de <i>P. mesopotamicus</i> e utilização no experimento.....	26
Figura 5 – Volume do sêmen coletado de <i>P. mesopotamicus</i> para congelamento.....	30
Figura 6 – Incubadoras experimentais utilizadas para a realização da taxa de fertilização de sêmen de <i>P. mesopotamicus</i>	33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Volume e concentração espermática obtida do sêmen fresco de *P. mesopotamicus* (n=6).....27
- Tabela 2 – Composição dos tratamentos utilizados para o congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus*.....28
- Tabela 3 – Composição da *Arthrospira* em pó (SPIRULINA platensis® em pó, 100g, OLSON, Macronutrição).....29
- Tabela 4 – Médias da motilidade (%) e duração (s) espermáticas do sêmen fresco de *P. mesopotamicus* utilizado para o congelamento (n=6) 34
- Tabela 5 – Osmolaridade das soluções tratamento utilizadas no congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus*.....35
- Tabela 6 – TABELA 6 – Média e desvio padrão da taxa de motilidade, motilidade progressiva, VCL, VSL, VAP e BCF e número de espermatozoides avaliados por amostra do sêmen de *P. mesopotamicus* congelado com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis* e utilizando 1% de NaHCO₃ como ativador durante o descongelamento.....36
- Tabela 7 – Atividade enzimática antioxidante de sêmen congelado de *P. mesopotamicus* suplementado com *Arthrospira*.....37
- Tabela 8 – Média e desvio padrão da integridade da membrana (%) pós - descongelamento do sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservado com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis*.....38
- Tabela 9 – Taxa de fertilização do sêmen congelado de *P. mesopotamicus* com diferentes tratamentos com suplementação de *Arthrospira*.....39

Tabela 10 – Média e desvio padrão dos parâmetros morfométricos relacionados ao desenvolvimento das larvas de 6dpe provenientes dos tratamentos com diferentes concentrações de <i>Arthrospira platensis</i>	40
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	13
2.1.1	Importância da reprodução induzida.....	14
2.2	Criopreservação espermática.....	15
2.2.1	Crioinjúrias.....	17
2.2.2	Estresse oxidativo.....	18
2.2.3	Soluções crioprotetoras.....	20
2.3	Avaliação espermática.....	21
2.3.1	Motilidade espermática.....	21
2.3.2	Morfologia espermática.....	22
2.3.3	Integridade de membrana.....	23
2.4	<i>Arthrospira platensis</i>	23
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Declaração de ética.....	25
4.2	Animais e estrutura.....	25
4.3	Avaliação do sêmen fresco.....	27
4.4	Congelamento do sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	28
4.5	Motilidade espermática do sêmen congelado.....	30
4.6	Integridade de membrana.....	31
4.7	Enzimas do estresse oxidativo.....	31
4.8	Taxa de fertilização.....	32
4.9	Morfometria larval.....	33
4.10	Análises estatísticas.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1	Avaliação do sêmen fresco.....	34
5.2	Osmolaridade.....	34
5.3	Motilidade espermática pós descongelamento.....	35
5.4	Estresse oxidativo.....	37
5.5	Integridade de membrana.....	38
5.6	Taxa de fertilização.....	39

5.7	Morfometria larval.....	40
	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um importante mercado relacionado à aquicultura que ao longo dos últimos anos vem se desenvolvendo cada vez mais, como resultado não apenas da geografia do país que possui uma das maiores bacias hidrográficas do mundo, mas também devido a disseminação de conhecimentos e tecnologias para com os produtores. E dentro desse cenário a piscicultura se estabelece como um dos importantes pilares, uma vez que a produção obtida através da prática de captura está estagnada, o cultivo de peixes em cativeiro se torna o principal alvo de investimento, tanto financeiro, como intelectual.

Tendo em vista essas questões, faz-se necessário o aprimoramento de técnicas de criopreservação espermática em peixes, uma vez que esta biotecnologia possui como benefícios auxiliar na preservação de espécies com a criação de bancos de germoplasma, disseminação de genética de animais superiores. Aliado a isso, métodos de avaliação para a qualidade de sêmen também já foram descritos e estabelecidos, a exemplo temos a avaliação de motilidade, avaliações relacionadas a atividade enzimática relacionada ao estresse oxidativo e avaliações relacionadas a morfologia espermática (Motta *et al.* 2021).

O *Piaractus mesopotamicus*, também conhecido popularmente como Pacu e Pacu-caranha, é uma espécie de peixe de água doce, nativo do Brasil e cuja distribuição se encontra nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte (Rabaioli, 2020). Um peixe migratório, com desova total durante o período de piracema, sua reprodução é semelhante à de outros caracídeos, sendo considerados disseminadores livres (Silva, 2017). A fêmea libera seus ovos na água e o macho nada em volta fertilizando-os, os ovos eclodem em algumas horas quando mantidos em temperaturas adequadas e após dois ou três dias da eclosão os alevinos já consomem o conteúdo do saco vitelino e começam a nadar livremente. Porém, como é uma espécie migratória a criação em cativeiro enfrenta problemas, já que é necessário um estímulo final para haver tanto a desova, quanto a espermição. Além disso, como já mencionado, há espaço para pesquisas envolvendo protocolos de criopreservação que possam melhorar os resultados relacionados a qualidade e eficiência de sêmen para a espécie em questão (Chech; Moyle, 2004).

Logo, diante da necessidade do aprimoramento de protocolos de criopreservação, que permitam um aumento de desempenho do sêmen congelado de peixes e que sejam reproduzíveis na prática, este estudo propõe diferentes tratamentos envolvendo a suplementação com *Arthrospira platensis* que é uma cianobactéria do gênero *Arthrospira* que apresenta propriedades antioxidantes (Zeitoun *et al.* 2022). Além de, gerar dados que possam contribuir

para o aumento do conhecimento científico sobre biotecnologias da reprodução aplicáveis para a espécie *Piaractus mesopotamicus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Piaractus mesopotamicus*

Piaractus mesopotamicus (Figura 1) é uma espécie de peixe migratório, com ampla distribuição e nativo do Brasil, que pertence a família *Characidae* e da subfamília *Serrasalminae*, conhecido popularmente como “pacu” e “pacu-caranha, estando presente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte, com exemplares desde a bacia dos rios Paraguai, Uruguai, até a bacia do Rio do Prata (Rabaioli, 2020). Seu corpo é arredondado com coloração acinzentada, apresentando escamas pequenas, região ventral levemente comprida, podendo alcançar em média 53 cm, sua boca possui uma série de dentes no maxilar e seus indivíduos apresentam peso médio entre 8 e 20 kg, sendo que estes animais são utilizados principalmente na piscicultura e em reservatórios hidrelétricos com o objetivo de repovoamento, possuindo impacto muito relevante no âmbito de mercado aquícola (Galo *et al.* 2019).

Figura 1 – Exemplares de *Piaractus mesopotamicus*



Fonte: Autor (2024)

As fêmeas atingem comprimentos maiores que os machos e normalmente se apresentam em maior número, tais características se correlacionam com o dimorfismo sexual e também por esta espécie apresentar desova total e fecundação externa, as fêmeas necessitam de um espaço

na cavidade celomática para que possam produzir gametas e depois desova-los (Chech; Moyle, 2004).

O pacu é uma espécie onívora, com dieta diversificada entre frutos, folhas, caules, detritos orgânicos, pequenos crustáceos, moluscos e pequenos peixes, cuja expressão de mercado é baseada nas boas características zootécnicas intrínsecas aos espécimes, como boa adaptabilidade a criação em cativeiro e alimentação através de rações comerciais, fácil manejo e crescimento rápido. Durante a estação chuvosa os indivíduos permanecem em áreas inundadas, alimentando-se de vegetais e durante a estação seca permanecem no leito principal dos rios ingerindo qualquer alimento que esteja disponível (Rabaioli, 2020).

Devido a relevância da espécie *P. mesopotamicus* esforços envolvendo o aprimoramento de técnicas empregadas na produção de pacu em cativeiro, vem sendo realizados. Muitas delas já estão estabelecidas, porém questões sobre o cultivo de peixes nativos migratórios relacionadas a desova e espermiacão são evidentes, uma vez que em cativeiro o estímulo final para ocorrência natural desses fenômenos não acontece, sendo necessário induzir artificialmente com aplicação de hormônios. Outra questão é a criopreservação, que é uma técnica que influenciou de forma positiva no aumento da produção da espécie, trazendo melhorias na produção dos animais, porém é um campo onde há espaço para se alcançar melhorias (Silva, 2017).

O *P. mesopotamicus* atinge a maturidade sexual por volta dos 3 a 4 anos de idade, apresentando desova total, realizando migração durante a estação seca para maturação das gônadas e desovando na época chuvosa, onde as fêmeas podem produzir em média 1.200 ovócitos por grama de desova (Bock; Padovani, 2000).

A migração acaba desempenhando um papel importante, pois permite a busca de ambientes adequados para a fecundação dos ovos, para o desenvolvimento inicial e condições menores de predação. Além disso, durante o trajeto, fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, aumento do nível de água e disponibilidade de alimento associados às variações fisiológicas do indivíduo estão envolvidos na regulação das diferentes fases do ciclo reprodutivo (Chehade; Borella, 2015).

2.1.1 Importância da reprodução induzida

Em cativeiro, como já mencionado, a maioria dos peixes migradores não apresenta reprodução normal, já que as fêmeas não completam a maturação final dos ovócitos e os machos produzem pouco ou nenhum sêmen, sendo necessária a indução artificial, através da utilização de hormônios. Fato este, que ocorre com a espécie deste trabalho, tornando-se necessário a indução de reprodutores maduros, através do uso de substâncias como hormônios sintéticos e extrato bruto de hipófise de carpa para que a reprodução seja concluída de forma satisfatória. (Zohar *et al.* 2022).

A aplicação da reprodução induzida é um dos principais agentes influenciadores para a intensificação do cultivo de peixes, utilizando como base mecanismos endógenos associados a fatores ambientais que interferem e regulam o processo de maturação final dos ovócitos e espermiacão. Já que, quando estão contidos em tanques, os peixes migradores ficam privados desses fatores, resultando em falha na reprodução. Dessa forma, a dinâmica envolvida na reprodução de espécies migratórias em cativeiro na maioria dos casos não ocorre naturalmente e para obter sucesso reprodutivo nestas condições é necessária a manipulação de parâmetros ambientais ou alguma indução hormonal (Chehade; Borella, 2015).

2.2 Criopreservação espermática

A criopreservação tem como objetivo a manutenção da estrutura e funcionalidade das células, mantendo tecidos vivos em temperaturas a -196°C , conservando-os geneticamente viáveis e metabolicamente inativos, porém de forma reversível (Zaniboni-Filho; Baldisserotto, 2015).

A criopreservação é uma ferramenta importante para o setor de produção e reprodução de animais, uma vez que, melhora o aproveitamento de reprodutores, evita desperdícios e auxilia na disseminação de linhagens geneticamente superiores (Galo *et al.* 2019). Ou seja, os benefícios envolvem a utilização do sêmen de maneira eficiente e otimizada, principalmente quando este é de difícil obtenção ou proveniente de espécies cuja característica é a liberação de quantidades reduzidas de volume de esperma, simplificação do manejo de reprodutores e como já mencionado o intercâmbio de gametas provenientes de animais superiores favorecendo o melhoramento genético. Além disso, a técnica de criopreservação ainda evita o transporte de animais vivos, diminuindo custos de viagens e também permite o estabelecimento de bancos de germoplasma (Cabrita *et al.* 2014).

Ao longo dos anos a criopreservação de gametas de espécies nativas brasileiras, como *Brycon orbignyanus* (Maria *et al.* 2005) e *P. mesopotamicus* (Galo *et al.* 2019; Streit-Junior *et al.* 2009; Teodozia *et al.* 2020) foram sendo priorizados em função da relevância econômica e ambiental. Sendo que a técnica é considerada uma importante ferramenta para a produção de alevinos, proporcionando o aumento dos animais em cativeiro e conseqüentemente alavancando ainda mais o setor piscícola (Galo *et al.* 2019).

A técnica de congelamento de gametas é baseada na criopreservação de células, onde o processo é feito para retirar água do interior da célula espermática a fim de evitar a formação de cristais de gelo intracelular, permitindo que o sêmen seja armazenado por longos períodos, possibilitando a redução de custos com animais, preservação da variabilidade genética, dentre outros benefícios já mencionados. O processo de criopreservação em si envolve diferentes etapas, nas quais são utilizadas soluções crioprotetoras (crioprotetor intracelular e crioprotetor extracelular) sem que ocorra ativação dos gametas, utilização de ativadores que possam promover e prolongar a capacidade natatória dos espermatozoides e por fim o descongelamento (Murgas *et al.* 2001). Podendo ainda o método de congelamento ser dividido didaticamente em 3 etapas, a primeira seria a exposição das células à solução crioprotetora, a segunda seria a regulação osmótica das células com o meio extracelular e por último a redução da temperatura, passando pelo ponto de congelamento da água e da solução crioprotetora (Maria *et al.* 2015).

O sucesso no processo de congelamento e descongelamento de sêmen de peixes, depende das soluções crioprotetoras, utensílios corretos, das concentrações dos diluidores, curva de congelamento, tempo de equilíbrio, taxas de diluição. Sendo que alguns fatores afetam a motilidade, morfologia e composição do plasma (Maria *et al.* 2015). Mas, também depende de características inerentes ao indivíduo e a espécie trabalhada (Galo *et al.* 2019).

O cuidado referente a execução da técnica também é relevante, uma vez que, se o processo de resfriamento ocorre rapidamente, não irá ocorrer a perda de água do meio intracelular e dessa forma, o meio irá congelar formando cristais e durante o processo de descongelamento esses cristais formados anteriormente podem se recrystalizar, ficando ainda maiores e assim romper a membrana plasmática (Baldisserotto; Cyrino; Urbinati, 2014). Porém, células que são resfriadas lentamente sofrem severa desidratação e exposição a longo prazo a altas concentrações de soluto. Essa combinação resulta em efeitos prejudiciais para as membranas celulares, onde além de enfraquecer, também pode lesá-las. Logo, a taxa de congelamento precisa ter o tempo ideal para permitir a desidratação correta, diminuindo a formação de gelo intracelular, mas célere o bastante para impedir que as células sejam expostas

a concentrações altas de solutos por períodos longos (Benson *et al.* 2012). Em relação ao *P. mesopotamicus*, temos diferentes trabalhos, utilizando diferentes metodologias no que diz respeito a protocolos de congelamento, por exemplo, trabalhos de Paulino *et al.* (2012) onde foi testado diferentes temperaturas e diferentes tempos de descongelamento de sêmen da espécie (60 °C em 8 segundos e 40°C em 12 segundos) demonstrando ser aceitáveis. E o trabalho de Teodozia *et al.* (2020) onde foram comparadas duas formas de congelamento, por dry sheper ou máquinas de congelação programada, sendo que não foi encontrada diferença estatística entre os métodos. Porém, de modo geral, o princípio de congelamento e descongelamento no tempo mais adequado à espécie deve ser mantido, para se evitar as chamadas crioinjúrias.

2.2.1 Crioinjúrias

Apesar dos importantes benefícios do processo de criopreservação, ainda existem malefícios que são inevitáveis, por exemplo os danos à estrutura e fisiologia celular, que alteram o desempenho dos gametas devido as chamadas “crioinjúrias” que ocorrem durante as etapas de congelamento e descongelamento. Nesse processo, a membrana plasmática, peça intermediária e flagelo são as estruturas mais afetadas, principalmente pela mudança na temperatura e formação de cristais de gelo (Cabrita *et al.* 2014). No trabalho de Galo *et al.* (2019), com sêmen de pacu fresco e criopreservado, sobre suas influências na qualidade espermática, é demonstrado que o sêmen pós-descongelamento além de apresentar 29,34% a mais de defeitos primários de espermatozoides (71,86% do sêmen pós-descongelamento e 42.52% do sêmen fresco), também apresentava uma maior porcentagem de células anormais (64.61% do sêmen pós-descongelamento e 49.89% do sêmen fresco). No trabalho de Streit-Junior *et al.* (2009), o processo de criopreservação provocou redução ($P<0,05$) no percentual de espermatozoides normais de 40,21% para 31,10% em relação ao sêmen *in natura*. Já o percentual de espermatozoides com patologias primárias aumentou ($P<0,05$) em 14,46% no sêmen pós-descongelamento, a motilidade progressiva foi reduzida ($P<0,05$) em 66,45% e o vigor espermático, em 34,20% ($P<0,05$). A anormalidade de cauda dobrada aumentou ($P<0,05$) em 65,00% no sêmen avaliado pós-descongelamento, assim como a patologia “cauda quebrada”, em 41,25%.

A principal fonte de dano as estruturas do espermatozoide é a formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO's), que são induzidas tanto pela mudança brusca de temperatura,

como a formação de cristais de gelo, onde as ERO's induzem a peroxidação lipídica, degradação de proteínas de membrana e conseqüentemente resultando em extravasamento de substâncias do meio intracelular, perda da fluidez e lesão a integridade de membrana. Além disso, lesões na membrana das mitocôndrias também prejudicam a dinâmica respiratória em função da formação das ERO's, resultando no aumento do estresse oxidativo sofrido pelos gametas. E os danos ocorridos no flagelo estão correlacionados com mudanças nas proteínas flagelares culminando em distúrbios de motilidade e conseqüentemente diminuindo a taxa de fertilização (Xin *et al.* 2020).

2.2.2 Estresse oxidativo

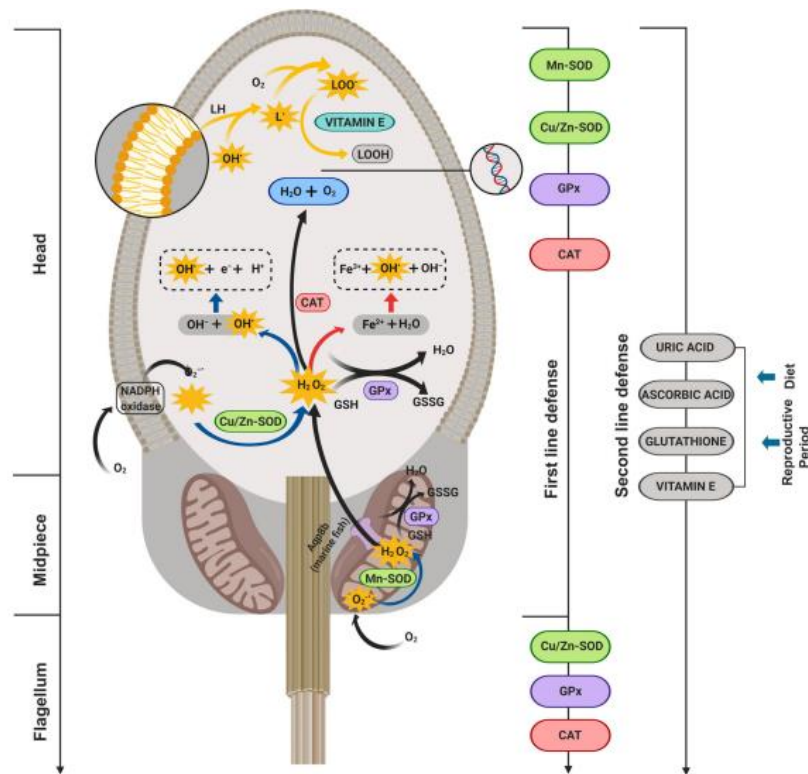
Espécies reativas de oxigênio é o termo geralmente utilizado para denominar substâncias derivadas do oxigênio. Estas, tem a função influenciada por sua característica, concentração, localização e tempo de exposição. Podendo ser divididas em 2 grupos, radicais e não radicais. O grupo das espécies radicais compreendem as substâncias: ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot), por exemplo, enquanto as espécies não radicais compreendem, por exemplo, moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Félix *et al.* 2021).

Os efeitos nocivos aparecem quando em função de fatores como manejo, armazenamento, técnicas de resfriamento e criopreservação promovem a produção e acúmulo de espécies reativas ao oxigênio e embora o plasma seminal e os espermatozoides contenham substâncias antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, o estresse oxidativo gerado compromete a integridade das membranas plasmática, mitocondrial, a estrutura do DNA, proteínas, carboidratos, resultando ao final na redução da motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização dos gametas (Kolyada *et al.* 2023).

O espermatozoide, como já mencionado, possui seu próprio sistema de defesas (Figura 2), apresentando principalmente os seguintes compostos enzimáticos: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione s-transferase (GST). A SOD é responsável por catalisar a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e O_2 ; A CAT catalisa a redução H_2O_2 para H_2O e O_2 ; já a GPx degrada H_2O_2 em água na mitocôndria (Sandoval-Vargas *et al.* 2021). Onde estas substâncias são o principal mecanismo de defesa intracelular contra os ERO'S. Porém, ainda existem componentes não enzimáticos que são responsáveis pela

proteção extracelular das células, como vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos graxos, carotenoides, dentre outros (Costa; Streit-Junior, 2019).

Figura 2 - Mecanismo de produção de ROS, peroxidação lipídica e defesa antioxidante em espermatozóides de peixes



Fonte: Sandoval-Vargas *et al.* (2021)

Embora as células já possuam naturalmente substâncias antioxidantes naturais protetoras, a defesa encontrada nos espermatozoides de peixes não é suficiente durante o processo de criopreservação, principalmente em função da diluição após exposição do esperma nas soluções. Dessa forma, a criopreservação leva a um desequilíbrio entre a produção de ERO's e o sistema antioxidante natural e dentro dessa ótica, a suplementação de meios de criopreservação com agentes antioxidantes é algo interessante na dinâmica de congelamento de gametas provenientes de diversas espécies de peixes, com o objetivo de minimizar as crioinjúrias decorrentes do processo de criopreservação (Cabrita *et al.* 2010).

Dessa maneira, pesquisas envolvendo a suplementação de antioxidantes ao meio de criopreservação do sêmen apresenta-se como uma forma de diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo contra as células espermáticas durante o processo de criopreservação,

proporcionando uma maior qualidade espermática após o descongelamento, resultando em maiores taxas de fertilização e eclosão, assim como demonstrado nos trabalhos de Öğretmen *et al.* (2014) onde foi evidenciado que a utilização de própolis promovia um aumento da taxa de eclosão para a espécie de carpa comum (*Cyprinus carpio*). Além do trabalho de, Palhares *et al.* (2021), onde trabalhando com a suplementação de melatonina, também foram encontrados resultados superiores ao grupo controle, relacionados a taxa de fertilização de sêmen pós-descongelamento. Entretanto, como existem inúmeras espécies de peixes, é necessário a elaboração de mais pesquisas envolvendo soluções crioprotetoras, suplementação com antioxidantes e correlacionar com as determinadas espécies trabalhadas.

2.2.3 Soluções crioprotetoras

As soluções crioprotetoras são utilizadas para proteger os espermatozoides através da diminuição do ponto de congelamento do conteúdo intracelular e da água extracelular, além de formar uma camada protetora ao redor das membranas de espermatozoides, sendo dessa forma, classificadas em dois grupos, intracelulares e extracelulares (Hezavehei *et al.* 2018).

Os agentes crioprotetores intracelulares são geralmente moléculas não iônicas e osmoticamente inativas, porque são igualmente distribuídas nos espaços intracelulares e extracelulares. Basicamente o crioprotetor intracelular atua reduzindo o ponto de congelamento do meio extracelular, atenuando os efeitos deletérios causados pela formação dos cristais de gelo, regulando a velocidade de desidratação das células e reduzindo os danos causados pela alta concentração dos solutos. As soluções crioprotetoras extracelulares são substâncias de alto peso molecular e podem ser divididas em moléculas osmoticamente ativas e compostos osmóticos inativos que recobrem a superfície da célula, estabilizando a membrana, além de restituir os fosfolipídios perdidos pelos espermatozoides durante o choque térmico (Salmito-Vanderley *et al.* 2016).

Em Characiformes do gênero *Piaractus*, os meios diluidores relatados na literatura para o processo de congelamento de sêmen são: glicose, água de coco em pó, Beltsville Thawing Solution[®] (BTS). Dentre os crioprotetores, os mais utilizados são o dimetilsulfóxido (DMSO), a gema de ovo, o glicerol e o metanol (Teodozia *et al.* 2020).

2.3 Avaliação espermática

A determinação da qualidade do sêmen é um dos passos primordiais para eficiência da fertilização, seja utilizando sêmen fresco ou sêmen congelado, qualidade esta influenciada pela manipulação correta do sêmen, seleção de bons reprodutores e execução correta das técnicas de criopreservação e resfriamento. Apesar da variação dentre os próprios indivíduos da espécie, existem parâmetros comuns que podem ser avaliados, como o volume de sêmen, pH, concentração espermática, estrutura do espermatozoide, motilidade, vigor espermático, duração da motilidade e morfologia espermática. Dessa forma, uma combinação de fatores pode aferir melhor a real qualidade do sêmen, principalmente após o congelamento dos gametas (Garcia *et al.* 2017).

Anormalidades morfológicas dos espermatozoides também são responsáveis por impactar na qualidade do sêmen, reduzindo a motilidade e resultando em menores taxas de fertilização. Dessa forma, avaliações acerca da morfologia espermática, assim como da integridade da membrana plasmática dessas células devem ser incorporadas na rotina de avaliação do sêmen, auxiliando na caracterização de amostras criopreservadas (Paulino *et al.* 2012).

Além disso, a avaliação dos componentes do plasma seminal, por exemplo, enzimas oxidativas, metabolitos, açúcares, vitaminas, aminoácidos e outras substâncias inorgânicas, podem fornecer informações muito úteis sobre o estado dos espermatozoides (Cabrita; Robles; Herraez, 2008).

2.3.1 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática realizada através softwares denominados de “Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), é realizada com o intuito de reduzir a subjetividade e obter informações mais assertivas e significativas sobre o movimento dos espermatozoides, permitindo uma padronização dos movimentos e permitir que seja possível fazer inferências sobre a qualidade do material proveniente dos reprodutores (Sanchez *et al.* 2021).

Existe atualmente um número considerável de parâmetros espermáticos que são usados para avaliar a qualidade do esperma em peixes como a osmolaridade, composição plasmática,

densidade espermática, morfologia das células associadas à capacidade dos gametas masculinos de fertilizar os ovócitos. Ademais, dentre os parâmetros mais comuns de serem avaliados a motilidade espermática é um dos principais relacionados a qualidade sêmen após a criopreservação, sendo inclusive correlacionado com a fertilidade daquele material e considerada padrão de qualidade (Gallego *et al.* 2018; Garcia *et al.* 2017).

Diferentemente dos mamíferos, a fertilização da maioria dos peixes, incluindo o *P. mesopotamicus*, é externa, com os espermatozoides estando imóveis nas gônadas masculinas antes da ejaculação, onde a osmolaridade e o conteúdo iônico, presentes na água, são fatores centrais para a ativação do movimento (Bobe; Labbé, 2010).

Existem duas avaliações acerca da motilidade, uma subjetiva, cujo observador normalmente considera a porcentagem de espermatozoides móveis, duração da motilidade e o tipo de movimento para a estimativa. Outra avaliação, mais objetiva, que usufrui de softwares, sistemas automatizados definidos como análises espermáticas assistidas por computador (CASA) para avaliar a motilidade em espermatozoides criopreservados. Existindo no mercado alguns softwares que são pagos para haver liberação da licença de utilização, mas também se encontram disponíveis softwares de código aberto, como o ImageJ, que possuem um plugin em suas configurações que da mesma forma permite a avaliação da motilidade espermática (Gallego *et al.* 2018). A análise espermática usando softwares, normalmente inclui análise de velocidade curvilínea, velocidade média, velocidade em linha reta e velocidade progressiva. Tais características se relacionam com a motilidade espermática e a capacidade de localizar e penetrar a região da micrópila (Browne *et al.* 2015).

A motilidade progressiva está diretamente relacionada com o vigor espermático., onde as características do sêmen do reprodutor determinam a porcentagem de gametas móveis, considerados então vivos e sua movimentação. Além disso, normalmente alterações morfológicas podem levar a uma perda de qualidade relacionada a diminuição da motilidade. Além disso, há uma correlação positiva entre fertilização e boa qualidade de motilidade espermática (Galo, 2009).

2.3.2 Morfologia espermática

A estrutura morfológica dos espermatozoides de peixes reflete sua história evolutiva, podendo ser subdividido em cabeça, peça intermediária e cauda. Além disso, essa

particularidade do acrossoma é compensada pela presença da micrópila no ovócito, que nada mais é que um orifício no córion do ovo para penetração do espermatozoide (Maria, 2005).

E como já mencionado anteriormente, a morfologia dos gametas é um ponto de interesse na avaliação da qualidade do sêmen, já que a presença de alterações influencia na motilidade e vigor espermático. Não apenas isso, quando focamos na avaliação posterior ao processo de congelamento e descongelamento do esperma, toda essa dinâmica pode provocar problemas de alteração na integridade das membranas celulares resultando na redução da capacidade do espermatozoide de fecundar o ovócito (Streit-Junior *et al.* 2009).

2.3.3 Integridade de membrana

Os processos de congelamento e descongelamento podem resultar em grande mortalidade dos espermatozoides, principalmente por danificarem estruturas celulares, como por exemplo, a membrana celular, e isso implicaria em redução da taxa de fertilização. A fragmentação do DNA no esperma é frequentemente resultado do estresse oxidativo gerado no processo de criopreservação e as membranas celulares são particularmente sensíveis a esse fenômeno, pois contém altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados (Jeuthe *et al.* 2022).

A integridade da membrana espermática é normalmente utilizada como um dos indicadores da quantidade de espermatozoides vivos e mortos. Cujas técnicas são baseadas na alteração da permeabilidade da membrana para certos íons a partir do momento em que ocorre a morte celular, após lesões na membrana plasmática. Dessa forma, existem métodos que usufruem de corantes específicos aplicados sobre as amostras de sêmen, permitindo identificar gametas vivos e mortos através de análise direta sob microscópio como a coloração eosina/negrosina (Teodozia *et al.* 2020).

Em trabalhos realizados com truta arco-íris a proporção de gametas vivos e mortos se correlacionava com a estimativa percentual subjetiva da motilidade espermática (Maria *et al.* 2015).

2.4 *Arthrospira platensis*

A *Arthrospira* é uma cianobactéria azul esverdeada considerada um antioxidante natural com atividade antiperoxidativa lipídica, composta por vitaminas, minerais, proteínas, ácido c-linoléico (lipídios). Além disso, o sistema de proteção antioxidante da *Arthrospira* ainda

comporta agentes enzimáticos como a SOD, GPx, CAT, bem como componentes não enzimáticos como carotenóides, ácido ascórbico, tocoferol, derivados da clorofila (Zeitoun *et al.* 2022).

Já existem trabalhos relatando o efeito positivo da *Arthrospira* na qualidade espermática, como o trabalho de Granaci (2007) onde os resultados referentes ao volume de ejaculação (aumento de 27,98% em comparação ao grupo controle) e motilidade dos espermatozoides (aumento de 12,5%) aumentaram em suínos que estavam sob administração de injeções de extratos a base de *A. platensis*. Além disso, a adição de *Arthrospira* sobre solução crioprotetora melhorou a qualidade do sêmen de búfalos quanto aos parâmetros de atividade antioxidante e diminuição das taxas de peroxidação lipídica dos espermatozoides criopreservados, aumento de 23,34% da motilidade pós-descongelamento em comparação com o grupo controle e uma diminuição de 10% a menos em comparação ao grupo controle em relação a danos ao acrossoma. (Badr *et al.* 2021).

As algas de forma geral possuem vários sistemas de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, fazendo a manutenção das ERO'S e protegendo as células. O sistema de desintoxicação enzimático consegue reduzir a maioria dos compostos tóxicos. O sistema enzimático elimina efetivamente os radicais de oxigênio, enquanto os carotenoides e os tocoferóis removem as ERO'S diretamente do leito pigmentar das algas, fornecendo proteção adequada sob condições de estresse (El-Baky *et al.* 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a suplementação de diferentes concentrações de *Arthrospira plantensis* em protocolo crioprotetor para a espécie *Piaractus mesopotamicus*.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Estudar a eficácia de *Arthrospira plantensis* sobre a qualidade através de avaliações de motilidade espermática, estresse oxidativo, taxa de fertilização e integridade de membrana do sêmen pós descongelamento
- Identificar a influência da *Arthrospira plantensis* sobre o estresse oxidativo e descongelamento espermático através da avaliação da atividade enzimática da SOD, CAT e GST;
- Verificar a taxa de fertilização e desenvolvimento das larvas após o uso de sêmen congelado suplementado com *Arthrospira plantensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Declaração de ética

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o nº 055/22.

4.2 Animais e estrutura

O trabalho foi desenvolvido durante as estações reprodutivas de 2022/2023 e 2023/2024, no mês de janeiro de 2023 e janeiro de 2024, quando foram utilizados 6 machos de *Piaractus mesopotamicus* (média de peso \pm 966g) provenientes da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG). A estação está localizada às margens do rio Grande, bacia do Paraná Superior, na cidade de Itutinga, em Minas Gerais.

Os reprodutores utilizados para o experimento foram mantidos em viveiros escavados (Figura 3) e a seleção para obtenção de gametas ocorreu através da observação de características externas como papila urogenital hiperêmica e liberação sêmen sob leve massagem abdominal. Após a captura, os animais foram pesados e transferidos para aquários de vidro da própria instalação de piscicultura, posteriormente foram submetidos a tratamento com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para induzir a espermição. A dose utilizada foi de aplicação única de 1 mg Kg⁻¹ e após 7 horas da aplicação os gametas foram coletados de acordo com o manejo da estação. Ou seja, após limpar e enxugar a papila urogenital com toalha de papel, foram

realizadas massagens manuais na parede da cavidade celomática, no sentido ântero-posterior (Figura 4), tomando-se cuidado para que não ocorresse contaminação com fezes, urina, sangue ou água do tanque, onde até o envase das palhetas, o sêmen foi mantido em tubos de fundo cônico do tipo Falcon de 15ml e em caixa térmica com gelo (- 4°C).

Figura 3 – Exemplo de viveiro escavado da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG)



Fonte: Autor (2023)

Figura 4 – Massagem realizada na cavidade celomática em sentido crânio-caudal para coleta de sêmen de *P. mesopotamicus* e utilização no experimento



Fonte: Autor (2023)

4.3 Avaliação do sêmen fresco

A concentração espermática foi estimada com o auxílio de uma câmara hematimétrica tipo Neubauer “Improved” através da contagem de 5 quadrados. Uma alíquota de 1 μL proveniente da mistura de 1 μL de sêmen previamente diluída em 999 μL de solução de formol citrato (2,9g de citrato de sódio, água destilada q.s.p 100mL, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35%), foi colocada na câmara hematimétrica e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 10.000, encontrando-se assim a quantidade de células por mm^3 . A transformação em espermatozoides/mL foi realizada multiplicando-se os valores encontrados por 10^3 (Os valores foram expressos como: resultado $\times 10^9$ spz/ml) (Miliorini *et al.* 2002).

A concentração espermática dos 6 machos utilizados nos experimentos encontra-se mais detalhada na tabela a seguir (Tabela 1). Onde foi observado o valor médio de $10,36 \times 10^9$ espermatozoides por ml (estendendo-se de $3,87 \times 10^9$ a $14,62 \times 10^9$ espermatozoides por ml de sêmen).

Tabela 1 – Volume e concentração espermática obtida do sêmen fresco de *P. mesopotamicus* (n=6)

Animal	Peso corporal (g)	Volume de sêmen (mL)	Espermatozóides $\times 10^9/\text{ml}$ (mL)
Branco/azul	600	7	14,45
Branco	1000	8	6,95
Branco/marrom	1000	6	13,70
Vermelho	1000	9,5	8,57
Branco/verde	1000	7	3,87
Azul	1200	11,5	14,62
Valores médios	$966,66 \pm 179,50$	$8,1 \pm 1,84$	$10,36 \pm 4,14$

Fonte: Autor (2024)

Para ativação da motilidade do sêmen fresco uma alíquota de 1 μL de sêmen de cada animal foi depositada em lâmina histológica de vidro e homogeneizada com 10 μL água retirada diretamente do tanque de vidro onde os animais estavam sendo mantidos. A motilidade espermática, das amostras de sêmen fresco foi observada em microscópio óptico de luz sob aumento de 10x sendo estimada em porcentagem média de células móveis em três campos, em uma escala de 0-100%. A duração foi determinada a partir da homogeneização da amostra de

sêmen com a amostra da água do tanque, onde estavam os animais, até que restassem apenas 10% de espermatozoides móveis.

Para avaliação do sêmen fresco, os parâmetros foram determinados de forma subjetiva (avaliação realizada apenas utilizando microscópio óptico) e os valores encontrados estão expressos no tópico de resultados.

4.4 Congelamento do sêmen de *Piaractus mesopotamicus*

Os tratamentos (Tabela 2) (diluidor + crioprotetor + suplementação) foram elaborados com base nos trabalhos de Zeitoun *et al.* (2022), Badr *et al.* (2021) e Streit-Junior *et al.* (2006), utilizando uma solução crioprotetora base (5% de DMSO + 4% de glicose diluído em 100 mL de água destilada), onde esta solução foi utilizada como grupo controle (grupo A) e os demais tratamentos propostos foram acrescidos com *Arthrospira platensis* no seguinte esquema, grupo B (solução base acrescida de 2% de *Arthrospira*), grupo C (solução base acrescida de 4% de *Arthrospira*), grupo D (solução base acrescida de 6% de *Arthrospira*) e grupo E (solução base acrescida de 8% de *Arthrospira*). A diluição final do sêmen foi de 1:3 (sêmen:diluidor + crioprotetor interno 5% + crioprotetor externo 4% + suplementação com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis*).

Tabela 2 – Composição dos tratamentos utilizados para o congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus*

Tratamento	Composição
A – Controle	Solução base
B	Solução base + 2mg DE <i>Arthrospira</i>
C	Solução base + 4mg DE <i>Arthrospira</i>
D	Solução base + 6mg DE <i>Arthrospira</i>
E	Solução base + 8mg DE <i>Arthrospira</i>

Fonte: Autor (2024)

Para a elaboração da solução crioprotetora, foram pesadas as diferentes concentrações de *Arthrospira* em pó obtida comercialmente (Tabela 3) e após isso, em um becker, foi adicionado glicose + DMSO, homogeneizados e por último adicionado a *Arthrospira* em pó, além disso foi necessário esquentar o recipiente enquanto ocorria a junção dos componentes e adicionada à *Arthrospira* em pó para que a homogeneização fosse satisfatória.

Tabela 3 – Composição da *Arthrospira* em pó (SPIRULINA platensis em pó, OLSON Macronutrição)

Componente	Peso (g)
Carboidratos	0,4
Proteínas	0,9
Gordura totais	0,1
Gordura saturada	0
Gordura trans	0
Fibra alimentar	0
Sódio	0,016,

Valores ajustados para uma porção de 1,5g

Fonte: Autor (2024)

Os valores relacionados a osmolaridade também foram mensurados, utilizando um osmômetro de pressão de vapor (Wescor vapro 5520, Logan, EUA).

O sêmen de 6 machos foi coletado e avaliado quanto ao volume total obtido (Figura 5) e envasado em palhetas de 0,5 mL (Minitub do Brasil[®]), acondicionadas em vapor de nitrogênio líquido de botijão DRY Shipper por um período de 24 horas. Ao final foram geradas 5 palhetas por tratamento por animal totalizando 150 palhetas no experimento (5 palhetas x 6 animais x 5 tratamentos).

Em seguida as palhetas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido onde ficaram armazenadas por um período de 90 dias, até serem coletadas amostras para os testes de estresse oxidativo. Além disso, após um período de 12 meses pós coleta do sêmen, este foi

descongelado novamente para a realização das análises de motilidade utilizando o CASA (Computerized Semen Analysis System), também foram realizadas avaliações da integridade de membrana e realização do teste de fertilização. A ativação espermática foi realizada com solução de 1% de NaHCO_3 .

Figura 5 – Volume do sêmen coletado de *P. mesopotamicus* para congelamento



Fonte: Autor (2023)

4.5 Motilidade espermática do sêmen congelado

As análises de esperma foram realizadas usando CASA (Computerized Semen Analysis System). A motilidade foi ativada com solução de 1% de NaHCO_3 em uma câmara de contagem Makler™ (Sef-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) acoplada a um microscópio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Tóquio, Japão), (objetiva de 20 ×), utilizando um filtro verde. O sêmen foi avaliado numa proporção de diluição final de 0,3 μl : 20 μl (sêmen/ativador). O microscópio foi ligado a uma câmara de vídeo (Basler Vision Technologies TMA602FC, Ahrensburg, Alemanha) que gera 50 imagens por segundo e a gravação de vídeo começou aproximadamente 10 s após a ativação (FIGURA 6). As imagens foram analisadas usando configurações padrão de FISH usando o software Sperm Class Analyzer™ (SCATM 2010, Microptics, SL Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Foram considerados os seguintes parâmetros: motilidade geral (Mot. Geral), motilidade progressiva (Mot. Progre.), velocidade curvilinear

(VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$) e frequência de batimento (BCF, hz). Uma média de $1026,57 \pm 318,50$ células espermáticas foram seguidas ao longo das imagens de vídeo gravadas num campo para determinar estes parâmetros.

4.6 Integridade de membrana

A avaliação da integridade da membrana foi efetuada utilizando a técnica de coloração com nigrosina-eosina. O esperma foi corado com nigrosina-eosina (1 μl de esperma: 10 μl de nigrosineosina), e 200 células foram contadas em campos distintos da lâmina histológica sob microscópio de luz (Eclipse E200, Nikon, Tóquio, Japão) com ampliação de 400 vezes. Cada palheta (animal/tratamento) foi analisada e espermatozoides brancos (sem coloração) foram considerados como tendo uma membrana intacta e aqueles com cabeça rosa ou vermelha foram considerados como tendo membranas danificadas. A integridade da membrana foi calculada como a percentagem de células não coradas em relação ao total de células contadas e em percentagem

4.7 Enzimas do estresse oxidativo

Após um período de 90 dias do congelamento, 30 palhetas foram descongeladas (1 para cada tratamento/animal) e alocadas temporariamente em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e análises foram realizadas no plasma seminal. Os resultados foram normalizados para o teor de proteína total, determinado por método de Bradford.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com (Madesh; Balasubramanian, 1998) baseado na autooxidação do pirogalol. A atividade da SOD foi expressa em unidades por mg de proteína, onde uma unidade de atividade da SOD é definida como a quantidade da enzima necessária para produzir 50% de dismutação do radical superóxido por minuto, sendo a leitura realizada a 570nm.

A atividade da Catalase (CAT) foi mensurada a 240nm (Aebi, 1984), neste método há uma diminuição da absorbância em 240nm devido a degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Os resultados foram expressos de modo que uma unidade de atividade da CAT

foi igual a μmol de H_2O_2 degradado por minuto por mg de proteína. As leituras das absorvâncias foram realizadas a cada 15 segundos por 3 minutos.

A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno estimada pela redução da absorvância a 340 nm por 3 minutos, em espectrofotômetro (Habig; jakoby, 1981). Os resultados foram expressos de modo que uma unidade de atividade da GST foi definida como $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.8 Taxa de fertilização

O teste de fertilização foi realizado 12 meses após a coleta do sêmen (estação reprodutiva de 2023/2024) e para sua realização 2 fêmeas de *P. mesopotamicus* (média de peso $\pm 2100\text{g}$) foram induzidas utilizando duas aplicações (10% na primeira aplicação e após 12h aplicação de 90%) seguindo a dose recomendada de 5 mg/kg. Após a coleta da desova (7h após a segunda aplicação), foi feito um pool da mesma e retirado 0,2 g de oócitos (média de 300 oócitos) que foram pesados em copos descartáveis de 50 mL, além disso uma palheta por animal/tratamento foi descongelado (60 °C por 8 s). Também foi recolhido o sêmen fresco de dois machos (previamente também induzidos com a dose recomendada de 1 mg/kg) e utilizado como controle para o teste. Para ativar a fertilização foi adicionado 3 mL de solução composta por 1 % NaCHO_3 aos copos, ademais foram efetuados movimentos circulares durante 90s e os ovos foram transferidos aleatoriamente para incubadoras experimentais compostas por armações feitas em cano PVC. As incubadoras foram dispostas no próprio tanque onde se encontravam os animais previamente, com oxigenação e renovação constante de água, onde os ovos permaneceram em movimento em temperatura média de 28°C (Figura 6). A taxa de fertilização foi determinada 8 h após a fertilização, quando o fechamento do blastóporo pode ser observado, analisando todos os ovos de cada incubadora usando uma estereomicroscópio. O resultado do cálculo da taxa de fertilização (%) está representado da seguinte forma:

$$\textit{Taxa de fertilização} = \frac{\textit{número de ovos fertilizados}}{\textit{número total de ovos}} \times 100$$

Figura 6 – Incubadoras experimentais utilizadas para a realização da taxa de fertilização de sêmen de *P. mesopotamicus*



Fonte: Autor (2023)

4.9 Morfometria larval

Após o teste de fertilização, as larvas resultantes dos diferentes tratamentos foram alocadas em aquários situados em racks automáticas, com um número de 15 larvas aquário. E com 6 dias pós eclosão (dpe), antes do início da alimentação exógena, amostras de 10 larvas por tratamento foram submetidas a avaliações morfométricas de acordo com Paula (2012), mensurando-se o comprimento total (focinho até a extremidade da nadadeira caudal), altura do corpo (região de maior altura no nível da nadadeira peitoral) e diâmetro do olho (diâmetro do olho em um plano ântero-posterior) para acompanhamento do desenvolvimento.

4.10 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software Minitab® 19.1 (State College, Pensilvânia, Estados Unidos). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Quando necessário, os dados foram transformados para atender pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando o modelo Box-Cox. Para avaliar as

diferenças entre os tratamentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do sêmen fresco

A avaliação dos parâmetros espermáticos do sêmen in natura é muito importante quando se considera o processo de criopreservação, uma vez que, a utilização de material de boa qualidade é preconizada (Cabrita *et al.* 2010). Os valores referentes a motilidade subjetiva e duração da motilidade podem ser encontrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias da motilidade (%) e duração (s) espermáticas do sêmen fresco de *P. mesopotamicus* utilizado para o congelamento (n=6)

Animal	Motilidade subjetiva (%)	Duração (s) (Até restarem 10% viáveis)
1	100	60
2	100	55
3	100	38
4	100	44
5	100	44
6	100	55

Fonte: Autor (2024)

Os valores obtidos nesse trabalho (tabela 4) em relação a motilidade superam aqueles encontrados por Streit-Junior *et al.* (2006) e Carvalho (2012), sendo 79,5% e 85% respectivamente.

É importante mencionar que fatores como variação ambiental, genética, período da estação reprodutiva podem justificar essa diferença, uma vez que elas são capazes de influenciar na qualidade do sêmen (Kopeika; Kopeika, 2008).

5.2 Osmolaridade

Esta variável possui relevância para o processo de criopreservação espermática de peixes, pois diferentemente do sêmen de mamíferos, o sêmen de peixes necessita de uma diferença entre a osmolaridade do sêmen e do meio em que se encontra para que ocorra a ativação dos espermatozoides. Dessa forma, é importante para a técnica de criopreservação que a solução crioprotetora não possua uma diferença significativa que implique na ativação dos espermatozoides de forma prévia (Motta *et al.* 2021). Os valores encontrados estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Osmolaridade das soluções tratamento utilizadas no congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus*

Tratamento	Osmolaridade (osmol)
A – Controle	1104
B – Solução base + 2mg de spirulina	1125
C – Solução base + 4mg de spirulina	1117
D – Solução base + 6 mg de spirulina	1125
E – Solução base + 8mg de spirulina	1109

Fonte: Autor (2024)

Os espermatozoides se encontram imóveis na gônada e um dos principais requisitos é que os diluidores possuam osmolaridade igual ou superior para que não ativem os espermatozoides de forma prévia (Motta *et al.* 2021). E considerando-se que o plasma seminal de peixes de água doce apresenta uma osmolaridade de 230 a 346 mOsm/kg, os valores apresentados acima atendem o requisito.

5.3 Motilidade espermática pós descongelamento

Os resultados apresentados apontam que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para as variáveis relacionadas a motilidade espermática do sêmen de *P. mesopotamicus* suplementado com *A. platensis* pós descongelamento (Motilidade total, motilidade progressiva, VCL, VSL, VAP e BCF) entre os diferentes tratamentos e em relação ao grupo controle. Os valores médios estão apresentados na Tabela 6. Porém, vale ressaltar que todos os tratamentos e o grupo controle apresentaram médias consideradas satisfatórias em um protocolo de criopreservação.

Tabela 6 – Média e desvio padrão da taxa de motilidade, motilidade progressiva, VCL, VSL, VAP, BCF e número de espermatozoides avaliados por amostra do sêmen de *P. mesopotamicus* congelado com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis* e utilizando 1% de NaHCO₃ como ativador durante o descongelamento (Continua)

Trat.	Mot. Geral (%)	Mot. Progre. (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)
A	34,3±24,2	5,30±4,73	64,06±6,29	29,83±7,51
B	50,80±15,98	8,65±2,32	66,13±5,30	35,23±4,90
C	38,01±3,51	4,71±0,15	57,66±4,97	30,80±1,91
D	45,54±11,32	7,17±1,83	64,96±4,59	33,67±4,64
E	39,41±9,42	7,46±4,92	63,04±7,06	34,69±12,35

Tabela 6 – Média e desvio padrão da taxa de motilidade, motilidade progressiva, VCL, VSL, VAP, BCF e número de espermatozoides avaliados por amostra do sêmen de *P. mesopotamicus* congelado com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis* e utilizando 1% de NaHCO₃ como ativador durante o descongelamento (Conclusão)

Trat.	VAP (µm/s)	BCF (hz)	Nº DE ESPERMAT. AVALIADOS
A	46,35±6,04	12,04±1,14	897±287
Controle			
B	48,24±0,89	11,47±0,87	1029±302
C	44,63±3,24	11,84±0,63	998±261
D	49,29±3,89	11,37±0,47	1148±265
E	49,02±9,21	11,47±1,73	1030±493

Fonte: Autor (2024)

Diferentemente dos resultados obtidos por Mizera *et al.* (2019), onde a suplementação com *Arthrospira* foi capaz de aumentar os parâmetros de VCL, VSL, VAP e motilidade progressiva no sêmen de touros simental, o presente trabalho não apresentou o mesmo impacto na qualidade de motilidade do sêmen de *P. mesopotamicus*. Resultado este, que também diverge com aqueles encontrados por Khair *et al.* (2021), que testou a suplementação com *Arthrospira* no sêmen de ratos intoxicados com arsênico, onde além de apresentar influencia antioxidante, foi capaz de melhorar a motilidade dos espermatozoides.

Segundo Sandoval-Vargas *et al.* (2021) o sistema de defesa antioxidante do sêmen de peixes, consiste em uma diversidade de substâncias antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, sendo as mais abundantes a superóxido dismutase (SOD), o ácido úrico e o ácido ascórbico. Porém, não parece existir uma relação sólida entre a defesa antioxidante do sêmen, a suplementação de meios de criopreservação e a proteção contra os danos causados pela criopreservação. Isto pode implicar que as ERO's não são as principais fontes de lesões celulares durante a criopreservação do sêmen de peixes, ou que os antioxidantes suplementados não têm efeito sinérgico e protetor suficiente. Para testar esta hipótese, novas pesquisas devem ser realizadas para determinar marcadores de estresse oxidativo combinados com os respectivos testes de qualidade do esperma. Principalmente porque a maioria dos estudos realizados baseiam-se na detecção de respostas relacionadas à motilidade espermática, integridade da membrana, fertilidade e deterioração do DNA. Com exceção da integridade do DNA, estas não são metodologias adequadas para determinar o estresse oxidativo.

5.4 Estresse oxidativo

O trabalho mostrou que não houve diferença estatística para a atividade da SOD e GST nos diferentes tratamentos. Em relação à CAT, também não houve diferença estatística entre as atividades enzimáticas encontradas entre os tratamentos e o grupo controle, porém houve diferença entre os tratamentos B e D com o tratamento C. Sendo evidenciado na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 – Atividade enzimática antioxidante de sêmen congelado de *P. mesopotamicus* suplementado com *Arthrospira*

Tratamento	SOD (U-SOD/mg de proteína)	CAT (U-CAT/mg de proteína)	GST (U-GST/mg de proteína)
A	85,07±55,40	5,48±1,87 ^{ab}	383,41±167,56
B	61,01±47,95	7,48±4,11 ^a	300,32±149,07
C	74,31±20,18	3,66±3,25 ^b	288,79±61,37
D	109,58±116,35	7,23±1,81 ^a	348,72±204,19
E	80,44±27,40	5,42±2,38 ^{ab}	254,07±58,98

Dados são expressos como média ± desvio padrão. Médias que não compartilham uma letra na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

Fonte: Autor (2024)

Segundo Zeitoun *et al.* (2022) e Badr *et al.* (2021) a suplementação com *Arthrospira platensis* no congelamento de sêmen de garanhões árabes e búfalos, respectivamente nos trabalhos, resultou em impactos sobre a atividade enzimática antioxidante do sêmen desses animais, ponto este de divergência com o presente trabalho, onde como demonstrado na Tabela 7, tanto em relação a SOD, quanto a GST não houve diferença significativa com o grupo controle e mesmo a CAT não apresentou diferença entre os tratamentos e o grupo controle.

Uma possível explicação para os efeitos diferenciados encontrados neste trabalho, em relação a atividade antioxidante, são os efeitos espécie-específicos exercidos pelos próprios antioxidantes ao serem adicionados nos meios de congelamento, assim como mencionado no trabalho de revisão de Lopes *et al.* (2016) e no trabalho de Salmito-Vanderley *et al.* (2016). Por exemplo, Pena *et al.* (2003) de javali encontrou boas taxas de motilidade espermática quando adicionou vitamina E aos meios de congelação. Diferentemente, Cabrita *et al.* (2011) e Navarro *et al.* (2014) não obtiveram bons resultados para este parâmetro quando adicionaram este mesmo antioxidante aos meios de diluição seminal de *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* e de *P. lineatus*, respectivamente.

5.5 Integridade de membrana

Não houve diferenças na integridade da membrana dos espermatozoides pós-descongelamento entre o grupo controle e os diferentes tratamentos com *Arthrospira* em esperma criopreservado de *P. mesopotamicus*. Os valores relacionados a viabilidade das células avaliadas nos diferentes tratamentos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Média e desvio padrão da integridade da membrana (%) pós-descongelamento do sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservado com diferentes concentrações de *Arthrospira* (Continua)

Tratamento	Média
A	49,00±17,07
B	62,80±8,23
C	58,33±1,15

Tabela 8 – Média e desvio padrão da integridade da membrana (%) pós-descongelamento do sêmen de *P. mesopotamicus* criopreservado com diferentes concentrações de *Arthrospira* (Conclusão)

Tratamento	Média
D	57,17±11,67
E	63,00±4,94

Fonte: Autor (2024)

Semelhante aos resultados de Djalil *et al.* (2019), o presente trabalho também não evidenciou diferença estatística em relação aos resultados encontrados quanto a variável de integridade de membrana e a utilização de *Arthrospira*. No presente estudo, esta falta de diferença estatística entre o grupo controle e os diferentes tratamentos com suplementação de *Arthrospira* pode estar relacionada com o efeito do extensor de glicose, que já atua como um crioprotetor extracelular e tem a função de estabilizar a membrana (Varela-Junior *et al.* 2015).

5.6 Taxa de fertilização

Não houve diferenças estatísticas entre as taxas de fertilização entre o grupo controle e os tratamentos, apenas entre o tratamento E os demais tratamentos testados. Os valores estão evidenciados na Tabela 9.

Tabela 9 – Taxa de fertilização do sêmen congelado de *P. mesopotamicus* em diferentes tratamentos com suplementação de *Arthrospira*

Variável	Tratamento	Média
Taxa de fertilização (%)	SÊMEN	90,62±1,12 ^a
	FRESCO	
	A	51,94±12,64 ^{bc}
	B	41,13±16,96 ^c
	C	28,50±9,18 ^c
	D	36,50±0,00 ^c
	E	70,33±13,90 ^b

Dados são expressos como média ± desvio padrão. Médias que não compartilham uma letra na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

Fonte: Autor (2024)

Diferentemente dos resultados encontrados por El-Ratel *et al.* (2020), que demonstrou um efeito positivo na capacidade de fertilização dos espermatozoides de machos de coelho egípcio tratados com *Arthrospira*, o presente trabalho não evidenciou diferença estatística para os resultados de fertilização entre os tratamentos e o grupo controle.

Os resultados encontrados no presente trabalho podem ser explicados pelo impacto que o ovócito tem em relação a taxa de fertilização, onde de acordo com Allaman *et al.* (2012) em trabalho realizado com exemplares de curimba (*Prochilodus lineatus*) verificou-se que houve maior efeito materno sobre as taxas de fertilização e eclosão, além de evidenciar que o efeito paterno foi expressivamente menor.

Além disso, outros fatores externos também são capazes de influenciar a taxa de fertilização, como o volume da solução ativadora, onde até mesmo grandes volumes de água como solução ativadora podem levar a uma diminuição nas taxas de fertilização pois permitem o estabelecimento de uma situação de diluição do sêmen e como consequência, redução da possibilidade de encontro entre o espermatozoide e a micrópila (Leite *et al.* 2013).

5.7 Morfometria larval

Não houve diferenças entre as larvas provenientes do grupo controle e as larvas provenientes dos demais tratamentos. Os valores relacionados a mensuração morfométrica estão evidenciados na Tabela 10.

Tabela 10 – Média e desvio padrão dos parâmetros morfométricos relacionados ao desenvolvimento das larvas de 6dpe provenientes dos tratamentos com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis*. (Continua)

Variável	Tratamento	Média
COMPRIMENTO TOTAL (mm)	SÊMEN FRESCO	5,68±0,11
	A	5,61±0,09
	B	5,69±0,06
	C	5,62±0,04
	E	5,62±0,07
ALTURA DO CORPO (mm)	SÊMEN FRESCO	0,88±0,04
	A	0,95±0,05
	B	0,91±0,01
	C	0,95±0,01

Tabela 10 – Média e desvio padrão dos parâmetros morfométricos relacionados ao desenvolvimento das larvas de 6dpe provenientes dos tratamentos com diferentes concentrações de *Arthrospira platensis*. (Conclusão)

Variável	Tratamento	Média
ALTURA DO CORPO (mm)	E	0,91±0,01
DIÂMETRO ÂNTERO- POSTERIOR DO OLHO (mm)	SÊMEN FRESCO	0,39±0,01
	A	0,39±0,01
	B	0,38±0,01
	C	0,37±0,01
	E	0,38±0,01

Fonte: Autor (2024)

Os resultados obtidos condizem com o desenvolvimento descrito por Paula (2012), onde a média das larvas com 6dpe possuíam 5,89mm de comprimento total. Em relação as outras variáveis, estas também condizem com o trabalho mencionado. Dessa forma, observadas após o congelamento não influenciaram na sobrevivência e morfologia das larvas produzidas com esse sêmen

Segundo Santin *et al.* (2004) o grau de desenvolvimento dos peixes em geral está relacionado a uma série de fatores, dentre os quais se pode ressaltar a disponibilidade de alimento e condições de temperatura, o que no caso do experimento não foi possível observar, uma vez que este foi conduzido até a os 6dpe.

6 CONCLUSÃO

Considerando-se todos os resultados encontrados no presente trabalho, as concentrações de *Arthrospira platensis* utilizadas não foram capazes de influenciar os parâmetros relacionados à motilidade e integridade de membrana dos espermatozoides derivados do congelamento de sêmen da espécie *Piaractus mesopotamicus* suplementados com a *A. platensis*. Também não foram capazes de influenciar o desenvolvimento das larvas. Logo, a suplementação com *A. platensis*, nas diferentes concentrações testadas no presente trabalho, não foram capazes de influenciar os parâmetros relacionados a motilidade espermática pós-descongelamento de sêmen da espécie *P. mesopotamicus*. E considerando-se os resultados relacionados a atividade enzimática e taxa de fertilização, são necessários mais estudos acerca da utilização da *A. platensis* na suplementação de soluções crioprotetoras, além da necessidade da aplicação de outros testes mais específicos, como marcadores de estresse oxidativo e análises de integridade de DNA.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984
- ALAVI, S. M. H. *et al.* Sperm motility in fishes: (III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme. **Theriogenology**, v. 136, p. 143-165, 2019.
- ALLAMAN, I. B. *et al.* Efeito materno e paterno sobre as taxas de fertilização e eclosão em curimba (*Prochilodus lineatus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1584-1590, 2012.
- AMORIM, M. D. J.; RIBEIRO T. D. C. M. A piscicultura como alternativa para diminuir os impactos ambientais da produção de carne bovina. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 4, 2020.
- BALDISSERTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. 1. ed. Joboticabal: FUNEP, 2014
- BADR, M. *et al.* Spirulina platensis extract addition to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing potentials of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 18, 2021.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and Sperm Quality in Fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535–548, 2010.
- BOCK, C. L.; PADOVANI, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 495-501, 2000.
- BENSON, J. D. *et al.* The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682–1699, 2012.
- BROWNE, R. K. *et al.* Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 1- 13, 2015.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRAEZ, P. **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of Fish Sperm: Applications and Perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623–635, 2010.
- CABRITA, E. *et al.* The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Sciences**, v. 125, n. 1, p. 189-195, 2011.
- CABRITA, E. *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389–401, 2014.
- CARVALHO, Aline F. S. **Criopreservação de sêmen de pacu (*piaractus mesopotamicus*) e curimba (*prochilodus lineatus*)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

COSTA, B. B. C.; STREIT-JUNIOR, D. P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 2, p. 93-109, 2019.

CHECH, J. J.; MOYLE, P. B. **Fishes: An introduction to Ichthyology**. 5. ed. Pearson Prentice Hall, 2004.

CHEHADE, C. M.; BORELLA, M. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. **Neotropical ichthyology**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 205-211, 2015.

DJALIL, O. I. A. *et al.* Effects of hydro-ethanolic extract of spirulina (spirulina platensis) on semen characteristics and oxidative stress indicators in male rabbit (oryctolagus cuniculus). **Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences**, v. 2, n. 1, 2019.

EL-BAKY, Hanaa H.; EL-BAZ, F. K.; EL-BAROTY, Gamal S. Enhancement of antioxidant production in Spirulina platensis under oxidative stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 623-631, 2009.

EL-RATEL, I. T. Potential impact of spirulina alga as an antioxidant on improving semen production and oxidative stress in blood and seminal plasma of rabbit bucks. **Egyptian Poultry Science Journal**, v. 40, n. 1, p. 209-224, 2020.

FÉLIX, F.; OLIVEIRA, C. C. V.; CABRITA, E. Antioxidants in Fish Sperm and the Potential Role of Melatonin. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 36, 2021.

GALO, J. M. **Avaliação dos parâmetros seminais de pacu (*piaractus mesopotamicus*) e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das lavras**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009.

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*/Qualidade do semen fresco e criopreservado e sua influência nas taxas de fertilizacao, eclosao e qualidade das larvas de *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian journal of biology**, v. 79, n. 3, p. 438, 2019.

GALLEGO, V. *et al.* Subjective and Objective Assessment of Fish Sperm Motility: When the Technique and Technicians Matter. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1457–1467, 2018.

GARCIA, Raycon Roberto Freitas. **Qualidade seminal de reprodutores *Brycon insignis* e *Colossoma macropomum***. 2017. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, 2017.

GRANACI, V. Achievements in the artificial insemination of swine. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca**, v. 64, n. 2, 2007.

HABIG W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398-400, 1981.

HEZAVEHEI, M. *et al.* Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.

JEUTHE, H.; PALAIOKOSTAS, C.; JOHANNISSON, A. DNA fragmentation and membrane integrity in sperm of farmed Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Aquaculture**, v. 547, p. 737-537, 2022.

- KHAIR, Abul. *et al.* Spirulina ameliorates arsenic induced reproductive toxicity in male rats. **Animal Reproduction**, v. 18, n. 3, 2021.
- KOLYADA, M. N.; OSIPOVA, V. P.; BERBEROVA, N. T. Use of cryoprotectors and antioxidants in sturgeon semen cryopreservation. **Cryobiology**, v. 111, p. 30-39, 2023.
- KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. **Fish Spermatology**, p. 347-397, 2008.
- LEITE, L. V. *et al.* Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 421 – 429, 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**, v. 40, n. 1, p. 29-34, 2016.
- MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian Journal of Biochemistry Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 184-188, 1998.
- MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*brycon orbignyanus*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MARIA, A. N. *et al.* Use of Cryotubes for the Cryopreservation of Tambaqui Fish Semen (*Colossoma Macropomum*). **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 109-114, 2015.
- MILIORINI, A. B. *et al.* Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 209-211, 2002.
- MIZERA, A. *et al.* Impact of the Spirulina maxima extract addition to semen extender on bovine sperm quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 601-607, 2019.
- MOTTA, N. C. *et al.* Sperm characterization and cryopreservation of the endangered freshwater fish *Chirostoma estor* (*Atheriniformes*). **Cryobiology**, v.103, p.81-86, 2021.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Anales de Veterinária de Murcia**, v. 17, p. 3-10, 2001.
- NAVARRO, R. D. *et al.* Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. **Acta Scientiarum**, v.36, n.1, p.55-60, 2014.
- ÖĞRETMEN, F.; INANAN, B. E.; ÖZTÜRK, M. Protective effects of própolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Cryobiology**, v. 68, p. 107-112, 2014.
- PALHARES, P. C. *et al.* Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of *Brycon orbignyanus* cryopreserved with melatonin in different freezing curves. **Theriogenology**, v. 176, p. 18-25, 2021

- PAULA, S. D. **Caracterização do desenvolvimento larval do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (holberg, 1887): morfometria e crescimento isométrico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2012.
- PAULINO, M. S. *et al.* Anormalidades espermáticas de *piaractus mesopotamicus* após descongelamento utilizando diferentes metodologias. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1591-1596, 2012.
- PENA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Sciences**, v.78, n.1, p.85-98, 2003.
- RABAIOLI, Adelita. **Viabilidade bioeconômica do sistema semi-intensivo de produção de pacu em tanque escavado**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade Federal de Santa Maria. Palmeira das Missões, 2020.
- RAHIM, A. *et al.* Effect of C-phycoyanin purified from *Spirulina platensis* on cooled ram semen quality and in vivo fertility. **Theriogenology**, v. 215, p. 234-240, 2024.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; NASCIMENTO, R. V. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelação e uso de antioxidantes. **Revista Brasileira em Reprodução Animal**, v. 40, n. 4, p. 194-199, 2016.
- SANCHES, E. A. *et al.* Tecnologias aplicadas à reprodução de peixes amazônicos. *In*: MATTOS, B. O.; PANTOJA-LIMA, J.; OLIVEIRA, A. T.; ARIDE, P. H. R. (org.). **Aquicultura na Amazônia: Estudos Técnico-científicos e Difusão de Tecnologias**. Ponta Grossa: Atena, 2021. p. 222-239.
- SANDOVAL-VARGAS, L. *et al.* Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 365-387, 2021.
- SANTIN, M. *et al.* Mudanças ontogênicas no trato digestório e na dieta de *Apareiodon Affinis* (Steindachner, 1879) (Osteichthyes, Parodontidae). **Acta Scientiarum**, v. 26, p. 291-298, 2004.
- SILVA, Adriano Rayol. **Preservação *ex situ* de germoplasma do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, holmberg,1887)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Universidade Federal do Rio Grande, São Lurenço do Sul, 2017.
- STREIT-JUNIOR, D. P. *et al.* Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 3, 2006.
- STREIT-JUNIOR, D. P. *et al.* Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim Do Instituto De Pesca**, v. 35, n. 2, 2009.
- TEODOZIA, E. R. P. *et al.* Semen cryopreservation in *Piaractus mesopotamicus*: the effect of different diluents and freezing equipment. **Ciência agrônômica**, v. 51, n. 2, 2020.
- VALLADÃO, G. M. R. *et al.* South american fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

VARELA-JUNIOR, A. S. *et al.* Corcini, methods of cryopreservation of tambaqui semen, *colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, v.157, p.71-77, 2015.

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

XIN, M. *et al.* Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 909-924, 2020.

ZOHAR, Y. *et al.* A half century of fish gonadotropin-releasing hormones: Breaking paradigms. **Journal of neuroendocrinology**, v. 34, n. 5, 2022.

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

ZEITOUN, M. M. *et al.* Spirulina supplementation to the semen extender influences the quality and antioxidant parameters of chilled or cryopreserved arabian stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104-108, 2022.