



BRUNA CONCEIÇÃO FERREIRA

**CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*) EM ULTRAFREEZER(-80 °C) PARA
FINS DE MELHORAMENTO GENÉTICO**

**LAVRAS – MG
2026**

BRUNA CONCEIÇÃO FERREIRA

**CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EM
ULTRAFREEZER(-80 °C) PARA FINS DE MELHORAMENTO GENÉTICO**

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. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Coorientador

**LAVRAS – MG
2026**

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

Ferreira, Bruna Conceição.

Conservação de sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em ultrafreezer (-80 °C) para fins de melhoramento genético / Bruna Conceição Ferreira. - 2026.
49 p. : il.

Orientador: Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Coorientador: Luis David Solis Murgas

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2026.
Bibliografia.

1. Criopreservação. 2. Fertilização. 3. Melhoramento genético. I. Freitas, Rilke Tadeu Fonseca de. II. Murgas, Luis David Solis. III. Universidade Federal de Lavras. IV. Título.

BRUNA CONCEIÇÃO FERREIRA

**CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EM
ULTRAFREEZER(-80 °C) PARA FINS DE MELHORAMENTO GENÉTICO**

**PRESERVATION OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SEMEN IN AN ULTRA-
FREEZER (-80°C) FOR GENETIC IMPROVEMENT PURPOSES**

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.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

UFLA

Profa. Dra. Fernanda Carlini Cunha dos Santos

UFVJM

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Coorientador

**LAVRAS-MG
2026**

Dedico este trabalho ao meu filho minha razão
de viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me auxiliado durante todo o percurso do mestrado.

Ao meu orientador e coorientador, Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas e Dr. Luis David Solis Murgas, pela orientação, apoio e confiança em meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade e pela excelência acadêmica.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Aos membros da minha banca, pela disposição em contribuir com o trabalho e transmitir seus conhecimentos.

A todos os professores do Mestrado do Departamento de Ciências Veterinária da Universidade Federal de Lavras que contribuíram significativamente no percurso formativo.

À minha família, pelo incentivo e sempre acreditar que eu seria capaz e demais colegas de mestrado.

RESUMO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe tropical de água doce, originário da África, e uma das mais importantes espécies cultivadas como recurso alimentar no mundo. A reprodução e melhoramento genético são áreas imprescindíveis para o aumento da produtividade da tilapicultura. Nesse contexto, a fertilização artificial, bem como a colheita e criopreservação de sêmen e ovócitos de reprodutores de tilápia podem ser aplicados para fins de manipulação genética e transporte de materiais genéticos, assumindo papel relevante para a aquicultura e para a conservação de seus recursos genéticos. Embora a criopreservação de espermatozoides esteja bem desenvolvida em mamíferos, diferentes métodos têm sido usados para armazenar ou congelar sêmen de peixe, principalmente com a intenção de reduzir o uso de nitrogênio líquido, uma vez que ainda são escassos os protocolos definidos para peixes principalmente tilápias. A ideia de utilizar os ultracongeladores pode, entre outras vantagens, aumentar a capacidade de armazenar e facilitar a manutenção do sêmen em comparação aos recipientes de nitrogênio líquido. O objetivo deste estudo é desenvolver um protocolo para congelar e armazenar sêmen de tilápia-do-Nilo em ultracongelador. Foram selecionados 24 exemplares de tilápias macho maduros para proceder a extrusão de sêmen. Foram preparados pools de cada 3 machos, resultando em 8 pools de sêmen que foram previamente diluídos em solução contendo glicose 350 mM, Tris 30 mM e dimetilacetamida (DMA) a 10%, na proporção de 1:3 (sêmen: diluente). O pool de sêmen diluído foi equilibrado a 4 °C por 10 minutos e colocado em palhetas de 0,5 ml e selados com álcool polivinílico. Para cada pool diluído foram envasadas 4 palhetas, totalizando 32 amostras, que foram alocadas em vapor de nitrogênio líquido (-40 °C) por 10 minutos. Depois disso, metade das palhetas (n=16) congeladas foram mantidas no nitrogênio líquido (-196 °C), e a outra metade (n=16) foi mantida em ultracongelador (-80 °C). Após 30 dias de armazenamento, as palhetas contendo o sêmen foram descongeladas em banho-maria, a 30 °C por 30 segundos. Foram realizadas as seguintes análises: taxa e duração da motilidade espermática, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática e estresse oxidativo. Observou-se que ambos os processos de congelamento do sêmen afetaram a qualidade espermática do sêmen após descongelamento. Porém, amostras de sêmen criopreservadas em nitrogênio líquido apresentaram valores superiores para vigor espermático, taxa e duração da motilidade espermática e integridade de membrana em relação ao sêmen armazenado em ultracongelador ($P < 0,05$). Não foi observada nenhuma diferença nas alterações morfológicas avaliadas nos espermatozoides congelados no nitrogênio líquido e no ultracongelador. Contudo, a porcentagem de espermatozoides normais

foi maior ($P < 0,05$) no sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. As alterações espermáticas mais frequentes foram cabeça isolada e cauda levemente dobrada, que apresentaram porcentagem acima de 20%. Não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para os parâmetros de estresse oxidativo: peroxidação lipídica (PL), superóxido dismutase (SOD) e catalase para os tratamentos empregados no armazenamento de sêmen de tilápia. Foi possível identificar viabilidade seminal espermática no sêmen armazenado em ultracongelador por um período de um mês.

Palavras-chave: criopreservação; fertilização; melhoramento genético.

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a tropical deep-water fish, originally from Africa, and one of the most important species cultivated as a food resource in the world. Reproduction and genetic improvement are essential areas for the increase in tilapiculture productivity. In this context, artificial fertilization, such as the collection and cryopreservation of semen and oocytes from tilapia breeders, can be applied for the purposes of genetic manipulation and transport of genetic materials, assuming a relevant role for aquaculture and for the conservation of its genetic resources. Since sperm cryopreservation has been developed in mammals, different methods have been used to store or freeze fish semen, mainly with the intention of reducing or using liquid nitrogen, since there are still few protocols defined for fish, mainly tilapia. The idea of using deep freezers can, among other advantages, increase storage capacity and facilitate sperm maintenance compared to liquid nitrogen containers. The objective of this study is to develop an protocol for freezing and storing tilapia semen in the ultra-freezer. Were selected 24 specimens of mature male tilapia to proceed with semen extrusion. Prepared pools from every 3 males, resulting in 8 pools of semen that were previously diluted in a solution containing 350 mM glucose, 30 mM Tris and 10% dimethylacetamide (DMA), in a 1:3 ratio (semen: diluent). The diluted semen pool was equilibrated at 4 °C for 10 minutes and placed in 0.5 ml pallets and sealed with polyvinyl alcohol. For each diluted pool, 4 pallets are packaged, totaling 32 samples, which are placed in liquid nitrogen vapor (-40 °C) for 10 minutes. Afterwards, the half of the pallets (n=16) frozen were kept in liquid nitrogen (-196 °C), and the other half (n=16) was kept in ultra-freezer (-80 °C). After 30 days of storage, the pallets containing the semen are thawed in a double boiler, at 30 °C for 30 seconds. The following analyzes were carried out: Rate and duration of sperm motility, vigor, plasma membrane integrity, sperm morphology and oxidative stress. It was observed that both semen freezing processes affect the sperm quality of the semen after defrosting. Therefore, semen samples cryopreserved in liquid nitrogen presented higher values for sperm vigor, sperm motility duration and membrane integrity in relation to semen stored in an ultrafreezer ($P < 0.05$). No differences were observed in the morphological alterations evaluated in frozen sperm in liquid nitrogen and in an ultrafreezer. However, the percentage of normal spermatozoa was higher ($P < 0.05$) than semen cryopreserved in liquid nitrogen. The most frequent sperm alterations are the isolated head and slightly bent tail, which present a percentage of over 20%. No significant differences were verified ($P > 0.05$) for the oxidative stress parameters: lipid peroxidation (PL), superoxide dismutase (SOD) and catalase for the treatments used in tilapia semen preparation. It was

possible to identify spermatocidal viability in semen stored in an ultrafreezer for a period of one month.

Keywords: cryopreservation; fertilization; genetical enhancement.

INDICADORES DE IMPACTO

O presente trabalho, focado na otimização da conservação de sêmen de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em ultracongelador (-80 °C), apresenta impactos que abrangem o avanço científico básico e a aplicação direta na cadeia produtiva da piscicultura. A pesquisa estabeleceu um protocolo viável para a manutenção de bancos de germoplasma utilizando ultracongeladores, uma alternativa tecnicamente mais simples e de menor custo operacional em comparação ao uso de nitrogênio líquido (-196 °C). O impacto concreto é a simplificação da logística de conservação, permitindo que laboratórios com infraestrutura intermediária realizem o melhoramento genético. A tecnologia permite um ganho genético mais rápido nas pisciculturas. Estima-se que a padronização desses protocolos possa reduzir custos de manutenção de plantéis de reprodutores vivos, substituindo-os por bancos de sêmen, o que diminui gastos com ração, água e espaço físico. O público-alvo são os produtores de alevinos e gestores de estações de piscicultura do Brasil. A disseminação destes resultados permite que o conhecimento gerado na UFLA ultrapasse os muros da universidade, oferecendo ao setor produtivo ferramentas para a produção de peixes com maior desempenho zootécnico. A técnica pode ser utilizada por pesquisadores da área de reprodução animal, técnicos aquícolas, pequenos e médios produtores de tilápia e empresas especializadas em genética de peixes. Os impactos e ações deste trabalho classificam-se em Tecnologia e Produção: Pelo desenvolvimento de metodologias aplicadas ao aumento da eficiência produtiva na aquicultura. Esta pesquisa está diretamente alinhada aos seguintes ODS: ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável): Ao melhorar a eficiência da produção de proteína de alto valor biológico (peixe), contribuindo para a segurança alimentar. ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura): Pela inovação tecnológica em processos de biotecnologia animal aplicados à produção de alimentos. ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis): Ao otimizar o uso de recursos genéticos e reduzir perdas em sistemas produtivos de tilápia. As ações de pesquisa envolveram dois docentes, uma aluna de mestado, uma de doutorado e um técnico que atua na piscicultura da UFLA. De caráter institucional, é um item obrigatório como parte das exigências das PRPG/PROEC para os trabalhos de pós-graduação *Stricto sensu* da UFLA.

IMPACT INDICATORS

This work, focused on optimizing the conservation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) semen in an ultra-freezer (-80 °C), presents impacts that encompass basic scientific advancement and direct application in the aquaculture production chain. The research established a viable protocol for maintaining germplasm banks using ultra-freezers, a technically simpler and less operationally costly alternative compared to the use of liquid nitrogen (-196 °C). The concrete impact is the simplification of conservation logistics, allowing laboratories with intermediate infrastructure to carry out genetic improvement. The technology allows for faster genetic gain in aquaculture. It is estimated that the standardization of these protocols can reduce the maintenance costs of live breeder stocks, replacing them with semen banks, which reduces expenses with feed, water, and physical space. The target audience is fingerling producers and managers of aquaculture stations in Brazil. Disseminating these results allows the knowledge generated at UFLA to go beyond the university walls, offering the productive sector tools for producing fish with higher zootechnical performance. The technique can be used by researchers in the field of animal reproduction, aquaculture technicians, small and medium-sized tilapia producers, and companies specializing in fish genetics. The impacts and actions of this work are classified as Technology and Production: Through the development of methodologies applied to increasing productive efficiency in aquaculture. This research is directly aligned with the following SDGs: SDG 2 (Zero Hunger and Sustainable Agriculture): By improving the efficiency of high biological value protein production (fish), contributing to food security. SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure): Through technological innovation in animal biotechnology processes applied to food production. SDG 12 (Responsible Consumption and Production): By optimizing the use of genetic resources and reducing losses in tilapia production systems. The research activities involved two professors, a master's student, a doctoral student, and a technician working in fish farming at UFLA. Institutionally, this is a mandatory item as part of the PRPG/PROEC requirements for UFLA's stricto sensu postgraduate work.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do sêmen fresco de tilápias (n=24).	32
Tabela 2 - Alterações morfológicas dos espermatozoides e estresse oxidativo após descongelamento do sêmen de tilápias. (Continua).....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	15
2.2	Qualidade espermática	17
2.3	Criopreservação do sêmen de peixes	20
2.4	Melhoramento genético de tilápias	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Declaração de ética	27
4.2	Animais e estrutura	27
4.3	Colheita do sêmen	27
4.4	Análise do sêmen fresco	27
4.5	Protocolo de congelamento do sêmen	29
4.6	Descongelamento do sêmen e análises pós descongelamento	29
4.7	Estresse oxidativo	30
4.8	Análise estatística	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca como uma das espécies mais cultivadas na aquicultura mundial devido às suas características desejáveis, como robustez, rápido crescimento e capacidade de adaptação a várias condições ambientais. Suas características organolépticas, que se referem ao sabor, textura e aparência da carne, a torna uma escolha popular para o consumo. A tilápia é a segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo e amais produzida no país, com um volume de 343 mil toneladas em 2020 (Ribeiro *et al.*, 2024).

A tilápia é valorizada na aquicultura por sua reprodução natural e parcelada em cativeiro. Essa característica é economicamente vantajosa, pois reduz os custos de produção e garante um fornecimento contínuo de alevinos para diversas formas de criação (Arumugam *et al.*, 2023). No entanto, essa mesma característica de reprodução constante e não controlada representa um grande desafio para o melhoramento genético, por não se ter o controle e o registro das linhagens, complicando a exatidão e o sucesso desses estudos (Abaho *et al.*, 2025).

Nesse sentido, a criopreservação de sêmen de tilápia é uma ferramenta valiosa em protocolos de reprodução animal, principalmente para fins de melhoramento genético da espécie. Ela é empregada com a finalidade de preservar espécies e conservar a biodiversidade, sincronia reprodutiva, garantindo também a proteção de linhagens genéticas valiosas (Pereira; Blank; Roismann, 2024), além de facilitar de maneira geral os processos de reprodução da tilápia em cativeiro.

No entanto, a criopreservação de sêmen de peixes ainda é um campo que está em desenvolvimento para essa espécie. A maioria dos estudos sobre criopreservação de sêmen tem focado em outras espécies de água doce, como ciprinídeos, salmonídeos e bagres. Em peixes, essa prática é importante, mas os protocolos precisam ser ajustados para cada espécie devido às diferenças em suas características biológicas e fisiológicas (Bozkurt; Yavaş, 2016).

O processo de criopreservação de sêmen envolve procedimentos de armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido em longo prazo, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (Sharafi *et al.*, 2022). É uma biotecnologia com papel importante para a indústria da aquicultura e também para a conservação dos recursos genéticos aquáticos (Magnotti *et al.*, 2018).

O uso de sêmen congelado é crucial para programas de melhoramento genético, pois permite preservar o material genético de machos de alto valor por longos períodos. Isso facilita o cruzamento seletivo de linhagens com características desejáveis, como maior crescimento,

resistência a doenças ou adaptação a diferentes condições ambientais. O acesso a sêmen de indivíduos geneticamente superiores a qualquer momento garante a continuidade e a eficiência dos programas de seleção genética (Pereira; Blank; Roismann, 2024).

A criopreservação do sêmen de peixe tradicionalmente realizada com o uso de recipientes de vapor de nitrogênio ou gelo seco, antes da transferência para nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, enfrenta diversos desafios. Entre eles, estão os efeitos adversos causados por temperaturas extremamente baixas, variações na resposta individual dos machos, curvas de congelamento descontroladas e a toxicidade de crioprotetores usados para proteger o sêmen durante o processo de congelamento (Paula *et al.*, 2022). Esses fatores podem comprometer a viabilidade do sêmen, resultando em taxas variáveis de sucesso no uso posterior para fertilização.

De acordo com estudos como os de Herranz-Jusado *et al.* (2019) e Babiak *et al.* (1998), a criopreservação exige um controle rigoroso das condições de temperatura e o uso de crioprotetores adequados, o que pode ser complicado e requer equipamentos específicos. Além disso, a individualidade mencionada por Judycka *et al.* (2019) destacam que nem todos os machos respondem da mesma forma ao processo, o que adiciona mais variáveis a serem controladas.

Por isso, a implementação de um protocolo mais simples e controlado, utilizando ultracongeladores, pode ser uma alternativa viável para tornar a criopreservação do sêmen de peixes mais acessível (Shi *et al.*, 2025). Esse método, com controle mais preciso das curvas de congelamento e potencial para reduzir a dependência de crioprotetores tóxicos, pode facilitar a disseminação do uso de sêmen congelado, especialmente em regiões sem acesso a nitrogênio líquido. Além disso, os ultracongeladores possuem maior capacidade de armazenamento, o que poderia aumentar a disponibilidade de sêmen congelado para programas de reprodução e conservação (Paula *et al.*, 2022).

Por outro lado, o desafio com os ultracongeladores (-80°C) é garantir que a qualidade do sêmen seja mantida em níveis adequados, pois o nitrogênio líquido atinge temperaturas muito mais baixas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), o que oferece um ambiente ideal para a preservação de material biológico a longo prazo. Portanto, há uma necessidade contínua de estudos comparativos entre os métodos para assegurar que as novas tecnologias ofereçam a mesma eficiência ou uma eficiência equivalente à do método tradicional com nitrogênio líquido.

Diante disso, o objetivo desse estudo é desenvolver um protocolo para conservar e armazenar sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em ultracongelador.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Oreochromis niloticus*

Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) (Figura 1) é um peixe de água doce da família Cichlidae. originário da África que é cultivado em 125 países do mundo, isso a torna uma espécie com potencial para ser a maior espécie de aquicultura do mundo nas próximas décadas (El-Sayed, 2019). Porém 98% dessa criação encontra-se fora da área de distribuição nativa africana (Khaw; Ponzoni; Danting, 2008).

Figura 1 - Tilápia (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Engepesca (2022).

De acordo com El-Sayed (2019), a tilápia possui vários atributos que a torna atrativa na aquicultura, como: rápido crescimento, tolerância a diversas condições ambientais (como temperatura, salinidade, pH da água, concentração de amônia (NH_3), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3) e baixas concentrações de oxigênio dissolvido), resistência a estresse e a doenças, habilidade de reprodução em cativeiro e boas condições de aceitação de alimento logo após a absorção do saco vitelínico (Abd El-Hack *et al.*, 2022.).

A introdução da primeira espécie de tilápia no Brasil começou com a Tilápia Rendalli em 1952 e, posteriormente, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em 1971. A tilápia-do-Nilo foi trazida pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) para o Nordeste e usada em programas de peixamento e cultivo comercial. No entanto, ao longo do tempo, observou-se uma perda das características desejáveis, como o rápido crescimento e a

eficiência na conversão alimentar, devido à falta de pesquisas voltadas à seleção genética de indivíduos superiores (Pereira *et al.*, 2016).

A tilápia-do-Nilo é uma espécie de peixe muito valorizada na aquicultura devido à sua versatilidade. Sendo onívora, ela se adapta bem a diferentes ambientes e sistemas de cultivo. No sistema de produção extensivo, ela pode crescer com pouca ou nenhuma intervenção tecnológica, utilizando os recursos naturais disponíveis. Já em sistemas intensivos, como tanques-rede, a criação pode envolver utilização de rações formuladas e tecnologias avançadas, maximizando o crescimento e a produtividade. Essa capacidade de adaptação torna a tilápia uma das principais espécies para produção comercial de peixes, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (De Brito Romanzini; Da Costa, 2023).

Além disso, a tilápia tem sido utilizada como modelo animal em experimentos, isto porque a tilápia apresenta um ciclo reprodutivo curto, de aproximadamente 14 dias, o que permite a obtenção de um grande número de alevinos para experimentos durante todo o ano, pode ser reproduzida artificialmente em laboratório durante todo o ano para obter alevinos geneticamente totalmente fêmeas (XX) ou totalmente machos (XY). Seu genoma já foi sequenciado e uma plataforma de edição genética eficiente foi estabelecida. Com um tamanho corporal moderado, facilita a coleta de sangue suficiente para a medição de diferentes componentes e substâncias sanguíneas (Li *et al.*, 2024).

As características reprodutivas dessa espécie envolvem alta prolificidade, maturidade sexual precoce, elevada fecundidade e desova frequente, apresentando desafios para os piscicultores, devido ao superpovoamento dos tanques em um tempo curto. Os espermatozoides são liberados quando os testículos atingem a maturidade, a partir daí, percorrem o ducto espermático até a abertura urogenital, por onde são expelidos para o ambiente externo. Ao entrar em contato com a água, os espermatozoides tornam-se ativos e aptos para fecundar os óvulos, pois a diluição do potássio presente no sêmen favorece a sua eficiência no processo de fecundação (Silva *et al.*, 2015).

Ela atinge a maturidade sexual em um peso relativamente baixo, muitas vezes em menos de seis meses, antes de atingir o peso ideal para comercialização. Isso pode causar superpopulação, prolongar o período de engorda, aumentar a variação de peso no lote durante a despesca e reduzir o número de peixes que atingem o peso comercial, além de elevar os custos com alimentação, que é o maior custo variável na produção. Assim, o controle da reprodução é um dos maiores desafios enfrentados na criação de tilápias, já que a reprodução descontrolada pode afetar diretamente a eficiência da produção e a rentabilidade dos piscicultores (Turra *et al.*, 2010).

Além disso, o estresse causado em peixes em sistema de criação intensiva, destacando situações adversas como alta densidade populacional e procedimentos rotineiros de piscicultura (biometria, transporte, reprodução induzida e coleta de ovos), pode gerar efeitos negativos significativos, como perda de apetite, diminuição no crescimento, surgimento de doenças e até a morte. Assim, surge a importância de desenvolver e aplicar métodos que minimizem as alterações nas funções vitais e fisiológicas dos peixes, com o objetivo de reduzir a mortalidade, especialmente durante o transporte e outras atividades de manejo (Pereira *et al.*, 2016).

2.2 Qualidade espermática

A qualidade do sêmen é fundamental para o sucesso reprodutivo, pois a contribuição masculina desempenha um papel relevante na eficiência tanto reprodutiva quanto produtiva, além de fornecer material genético, os machos permitem maior e mais rápida pressão seletiva no processo de seleção. Fatores como concentração de espermatozoides, aspecto e volume do sêmen são essenciais para o bom desempenho reprodutivo, assim como parâmetros espermáticos, incluindo a motilidade progressiva e a proporção de células viáveis (Vieira *et al.*, 2011).

A qualidade do sêmen pode ser avaliada por meio da análise de aspectos como motilidade (%) e vigor espermáticos (score), duração da motilidade (s), pH, concentração de espermatozoides (espermatozoides ml^{-1}), integridade de membrana e morfologia espermática. A motilidade espermática, é um dos principais critérios de qualidade para sêmen de peixes, sendo influenciada por fatores como temperatura, estado nutricional, condições de análise, manejo e estresse dos doadores (Navarro *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2023).

Os espermatozoides de peixes são imóveis nos testículos. Durante a reprodução natural a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozoides do trato genital do macho dentro do ambiente aquoso em que os espermatozoides encontram os componentes solúveis da água do meio externo, principalmente íons (Billard; Cosson, 2020). A osmolaridade semelhante à do plasma seminal inibe a motilidade espermática, tanto em espécies de peixes de água doce como em espécies marinhas. Porém, a exposição do sêmen à hipertonidade da água salgada ou hipotonidade da água doce, promove a ativação da motilidade espermática (Legendre *et al.*, 2016).

Em peixes de água doce a redução da concentração de potássio ou osmolaridade do ambiente ao redor dos espermatozoides liberados em água doce afeta diretamente o flagelo e regula a iniciação da motilidade espermática. Os mecanismos de transporte de íons e água

através da membrana plasmática e a regulação do volume celular são importantes para manter a estrutura e a integridade funcional da célula. A capacidade da membrana plasmática do espermatozoide de peixe de se adaptar a mudanças ambientais drásticas é um pré-requisito essencial para a motilidade e o sucesso da fertilização. O fluido seminal é rico em muitos nutrientes e íons, alguns dos quais são importantes na manutenção da qualidade espermática quando estocados no estado imóvel no trato genital (Herrera; Bondarenko; Boryshpolets, 2021).

Acredita-se que as características da membrana plasmática que definem a osmorresistência da célula sejam devido à composição lipídica e proteica, que desempenha um papel crucial nesse processo: a desnaturação de ácidos graxos e colesterol são os principais fatores que controlam a fluidez e a flexibilidade da membrana, enquanto proteínas e lipídios contribuem para a permeabilidade da membrana à água e aos íons (Dawaliby *et al.*, 2016).

O transporte de água pode ser realizado por diversos mecanismos em diferentes tipos celulares. O transporte passivo, como osmose, difusão simples ou facilitada e filtração, ocorre através da membrana plasmática e não requer gasto de energia metabólica. A água também pode atravessar as membranas celulares por meio de poros seletivos à água, canais iônicos e cotransportadores, o que geralmente envolve consumo de energia e, portanto, é definido como transporte ativo (Herrera; Bondarenko; Boryshpolets, 2021).

O tempo de motilidade corresponde ao intervalo entre a ativação dos espermatozoides e o momento em que todas as células ficam imóveis (Pereira *et al.*, 2016). Na avaliação subjetiva, realizada sob microscópio, atribui-se uma pontuação de 0 a 100% conforme o percentual de espermatozoides móveis em um campo visual fixo (Neumann, 2019).

A diminuição da motilidade espermática é causada principalmente pela diminuição da reserva de energia que ocorre durante o tempo em que o espermatozoide está em movimento (Cosson *et al.*, 1999). Em peixes de água doce, a duração da motilidade espermática é bem variada entre as espécies, podendo oscilar de 30-40 segundos para carpa (*Cyprinus carpio*; Billard *et al.*, 1995) a 486 segundos para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Maria *et al.*, 2004).

O vigor espermático corresponde à rapidez de movimento dos espermatozoides e varia de 0 a 5. Esse vigor, juntamente com o tempo de vida dos espermatozoides, geralmente alinhado ao período de fertilização dos ovócitos, está diretamente relacionado à duração da motilidade espermática (Pereira *et al.*, 2016).

Embora o pH do sêmen tenha um efeito limitado na ativação dos espermatozoides em peixes, estudos de Lahnsteiner *et al.* (1996) encontraram uma relação significativa entre o pH do sêmen e a motilidade em *Alburnus* (Cyprinidae), sugerindo que o pH é uma característica relevante do plasma seminal, com influência sobre o potencial de mobilidade dos

espermatozoides. Em peixes de água doce, o pH do sêmen varia entre 6,5 e 8,5 (Vieira *et al.*, 2011).

A concentração espermática em peixes de água doce pode variar amplamente, com valores relatados de $1,97 \times 10^9$ spz/mL até $41,58 \times 10^9$ spz/mL, havendo diferenças significativas tanto entre indivíduos de uma mesma espécie quanto entre diferentes espécies (Vieira *et al.*, 2011).

A avaliação da integridade da membrana contribui para o sucesso da criopreservação, pois as membranas são vulneráveis a criodanos. Essa integridade é frequentemente verificada com corantes como eosina/nigrosina ou eosina isolada, e a observação simples ao microscópio permite distinguir espermatozoides vivos de mortos simultaneamente (Neyrão, 2022).

Os danos que ocorrem durante o processo de criopreservação induzem o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em peroxidação lipídica na membrana plasmática e mitocôndrias, bem como fragmentação de DNA e RNA (Cabrita *et al.*, 2014). Embora o espermatozoide possua um sistema de defesa contra agentes oxidantes, o processo de criopreservação também gera uma redução nos agentes antioxidantes devido à diluição do esperma e, conseqüentemente, do plasma seminal no meio crioprotetor, causando um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (Sandoval-Vargas *et al.*, 2021).

Para a análise da morfologia espermática, o sêmen é diluído em uma solução de 10 μ L de sêmen acrescentado a 990 μ L de solução de formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 mL) (Felizardo *et al.*, 2010). Em seguida, realiza-se um esfregaço em lâmina de vidro, utilizando 60 μ L de sêmen diluído e 9 μ L de rosa bengala como corante. Após secagem ao ar por cinco minutos, a lâmina é observada em microscópio óptico (Pereira *et al.*, 2016).

Alterações morfológicas nas células espermáticas podem comprometer a motilidade, resultando em uma redução na taxa de fertilização (Pereira *et al.*, 2016). Dentre as alterações morfológicas, os defeitos maiores podem ser divididos em: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, peça intermediária degenerada, cauda fraturada, cauda fortemente enrolada e cauda degenerada. Os defeitos menores são divididos em: cabeça isolada e cauda dobrada (Gracia, 2011).

A peça intermediária do espermatozoide de peixes consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice responsável pela geração de energia necessária à propulsão mótil dos espermatozoides. Os espermatozoides da maioria das espécies de peixes são desprovidos do acrossoma que está presente nos espermatozoides dos vertebrados, contudo, para que ocorra a

fertilização, os ovócitos apresentam a micrópila, uma abertura que facilita a entrada do espermatozoide e a fertilização (Cosson *et al.*, 1999).

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se às diferentes concentrações de proteínas, lipídios (Lahnsteiner *et al.*, 1996), açúcares e ácidos, responsáveis pelo metabolismo das células espermáticas. A avaliação morfológica espermática pode auxiliar contribuir na análise da qualidade fertilizante do sêmen e pode explicar insucessos em determinadas fertilizações (Fauvel; Suquet; Cosson, 2010).

2.3 Criopreservação do sêmen de peixes

Nas últimas décadas, a criopreservação de espermatozoides passou por avanços significativos, tornando-se amplamente utilizada em diversas espécies animais, incluindo a humana. No caso dos peixes, essa técnica tem se destacado pela sua importância na preservação de espécies ameaçadas, reprodução artificial e programas de melhoramento genético. De acordo com Wan Khadijah, Asmad, Abdullah (2008), mais de 200 espécies de peixes foram objeto de estudos sobre criopreservação de espermatozoides, com diferentes protocolos sendo desenvolvidos para otimizar o processo.

O congelamento de células ou tecidos inicia-se com a formação de gelo na parte externa, ao mesmo tempo em que surgem áreas com alta concentração de solutos, o que provoca exsmose e consequente desidratação da célula. Se o congelamento ocorrer de maneira controlada, há tempo suficiente para que a célula expulse a água interna, evitando a formação de cristais no interior celular. No entanto, esse processo nem sempre é ideal, podendo resultar na formação de cristais intracelulares, que causam danos irreversíveis à célula (Carneiro, 2007).

O sêmen puro não pode ser congelado diretamente, pois a maioria dos espermatozoides seriam danificados, por isso, é necessário adicionar soluções que preservem a viabilidade das células espermáticas durante o processo de resfriamento. Essas soluções devem conter substâncias que diluam e nutram as células, além de crioprotetores para protegê-las do choque térmico. Para que um diluidor seja adequado, ele precisa atender a certos requisitos, como: ser isotônico, evitando a ativação prematura da motilidade espermática, que pode consumir a energia necessária para a fertilização; ter estabilidade físico-química para que suas propriedades não se alterem em contato com o sêmen; possuir alta condutividade térmica, garantindo uma rápida transferência de calor entre o ambiente e os espermatozoides; ser estéril, sem a presença de microrganismos que possam prejudicar as células; fornecer nutrientes como fontes de

energia; e aumentar o volume do sêmen. Além disso, cada espécie animal tem suas particularidades, o que torna essencial ajustar a composição do diluidor às características específicas do sêmen de cada espécie e às técnicas de criopreservação utilizadas (Salmito-Vanderley *et al.*, 2012).

Para garantir o congelamento eficiente dos espermatozoides, é necessária a adição de substâncias crioprotetoras, que são classificadas como intracelulares e extracelulares. Os crioprotetores intracelulares, atuam removendo a água do interior da célula e diminuindo a temperatura de congelamento, evitando a formação de cristais de gelo dentro da célula. O dimetilsulfóxido (DMSO) é o crioprotetor mais comum na criopreservação de sêmen de peixe, embora substâncias como o glicerol e o metanol também sejam usadas em algumas espécies. Já os crioprotetores extracelulares, como a gema de ovo, revestem a célula externamente, estabilizam a membrana celular e minimizam os danos causados pelo congelamento, além de oferecer nutrientes e propriedades antioxidantes que ajudam na preservação do espermatozoide (Carneiro, 2007).

A diluição do sêmen com meios crioprotetores reduz os constituintes do plasma seminal, tornando o sêmen mais sensível a danos oxidativos (Martinez-Páramo *et al.*, 2012). Além disso, o processo pode causar perda de qualidade espermática, desencadeando uma série de eventos prejudiciais aos espermatozoides, como estresse osmótico, alterações na bioquímica do plasma seminal, desidratação celular e cristalização.

Como resultado, a qualidade espermática é afetada negativamente, especialmente a motilidade, a morfologia espermática e a atividade antioxidante (Paula *et al.*, 2012). Além disso, a variabilidade na qualidade inicial do sêmen influencia diretamente a capacidade dos espermatozoides de preservar suas características morfológicas e funcionais após a criopreservação e, portanto, o sucesso após o congelamento. Devido à perda de qualidade e à variabilidade após a criopreservação, é de extrema importância desenvolver modelos que possam prever a capacidade das células espermáticas de sobreviverem à criopreservação (Carvalho *et al.*, 2017).

Os métodos de preservação incluem uma etapa de diluição do esperma em um meio artificial. Para armazenamento de curto prazo, geralmente recomenda-se o uso de um meio semelhante às condições fisiológicas, enquanto que para congelamento, um crioprotetor é normalmente adicionado. Os crioprotetores são osmoticamente ativos e geralmente apresentam alta osmolaridade, pois sua principal função é desidratar as células (John Morris *et al.*, 2012).

Durante o processo de congelamento/descongelamento, a osmolaridade do meio circundante é alterada devido à cristalização parcial da água, o que afeta os espermatozoides e

pode desencadear sua motilidade. Assim, a capacidade dos espermatozoides de sobreviver a rápidas mudanças osmóticas e a vários ciclos de contração e expansão pode predizer crioresistência. Durante a criopreservação, o transporte de água ainda pode ser um fator importante, mas sua resposta não é suficientemente rápida para manter o equilíbrio do meio interno, especialmente em temperaturas baixas o bastante para retardar os processos biológicos. Nessas condições, a composição da membrana e as propriedades fisiológicas desempenham um papel crucial. A crioresistência dos espermatozoides pode estar relacionada à composição específica da membrana lipídica, em particular ao teor de PUFA (Horokhovatskyi *et al.*, 2016), ou à capacidade de resistir a alterações na osmolalidade ambiental.

Ao contrário da criopreservação, durante o armazenamento de curto prazo, os processos biológicos não cessam completamente, mas são retardados. Nessa situação, os espermatozoides podem ser afetados por subprodutos do metabolismo aeróbico normal, como espécies reativas de oxigênio (EROs). O dano oxidativo causa peroxidação lipídica, que afeta diretamente a viabilidade e o potencial de fertilização, podendo levar à fragmentação do DNA (Trigo *et al.*, 2015). Tais situações também favorecem o crescimento bacteriano no meio, levando à redução da qualidade dos espermatozoides.

Os espermatozoides são vulneráveis ao estresse oxidativo devido ao reduzido citoplasma, da composição de sua membrana plasmática rica em ácidos graxos polinsaturados e devido ao ambiente não fisiológico que são expostos durante o processo de criopreservação (Félix; Oliveira; Cabrita, 2021). Para neutralizar as ERO's o sêmen apresenta uma linha de defesa composta inicialmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e

peroxidação lipídica (PL). A SOD é responsável por catalisar a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e O_2 , seguida pela CAT que catalisa a redução H_2O_2 para H_2O e O_2 enquanto, a peroxidação lipídica é um processo destrutivo que ocorre nas membranas celulares, do qual promove a degradação oxidativa dos lipídios, especialmente dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) presentes nas membranas celulares, comprometendo a integridade e a fluidez da membrana celular, levando à disfunção celular e, eventualmente, à morte celular (Sandoval-Vargas *et al.*, 2021).

Portanto, antioxidantes e antibióticos são frequentemente adicionados aos meios artificiais, permitindo potencialmente um prolongamento significativo do armazenamento. Em geral, essas soluções são baseadas nas características do plasma seminal e são comumente chamadas de “fluido seminal artificial”, possuindo o mesmo pH, osmolalidade e composição iônica. Esses parâmetros são fatores críticos na fisiologia dos espermatozoides, não apenas

porque podem impedir a ativação da motilidade, mas também devido ao seu envolvimento em processos celulares rotineiros (Herrera; Bondarenko; Boryshpolets, 2021).

Os métodos convencionais de congelamento de sêmen incluem congelamento lento, rápido e ultrarrápido (também conhecido como vitrificação cinética). No congelamento lento, as células espermáticas são resfriadas gradualmente ao longo de 2 a 4 horas, em duas ou três fases, de forma manual ou automatizada, utilizando uma máquina programável. Este método pode resultar na formação de cristais de gelo, o que aumenta a concentração de eletrólitos nas células, causando potenciais danos químico-físicos aos espermatozoides. Para minimizar lesões osmóticas, as taxas de resfriamento precisam ser controladas. No congelamento rápido, os espermatozoides são misturados com um crioprotetor, colocados em palhetas e expostos à fase de vapor de nitrogênio líquido por pelo menos 10 minutos antes de serem imersos no nitrogênio líquido. A vitrificação, por sua vez, é uma alternativa que envolve o resfriamento ultrarrápido dos espermatozoides, mergulhando a suspensão diretamente em nitrogênio líquido. Essa técnica, conhecida como vitrificação cinética, pode ser realizada sem a necessidade de crioprotetores permeáveis (Hezavehei *et al.*, 2018).

O descongelamento, por sua vez, requer o mesmo nível de cuidado que o congelamento. A taxa de descongelamento precisa ser controlada para garantir a reidratação celular, devendo ser rápida o suficiente para evitar o crescimento de cristais intracelulares que podem danificar as células. Dada a diversidade entre as espécies de peixes quanto às características do sêmen, é essencial realizar experimentos prévios para determinar as condições ideais de congelamento e descongelamento, especialmente em espécies que ainda não foram amplamente estudadas (Carneiro, 2007).

Apesar dos desafios, a criopreservação oferece vantagens significativas, como a sincronização da disponibilidade de gametas, facilitando a reprodução em momentos mais oportunos. Além disso, possibilita o transporte seguro de material genético, previne o envelhecimento natural dos gametas e contribui para a conservação da diversidade genética. Essas vantagens reduzem os custos de manutenção dos plantéis reprodutores e facilitam a troca de material genético entre instituições e laboratórios de pesquisa. A importância da criopreservação no contexto da aquicultura e da conservação de espécies é evidente, pois ela permite maior controle e eficiência no manejo reprodutivo, promovendo tanto a produtividade quanto a preservação da biodiversidade (Pinheiro *et al.*, 2018).

2.4 Melhoramento genético de tilápias

Os programas de melhoramentos genéticos de peixes têm como principal objetivo impulsionar as bases de uma produção aquícola sustentável, com resultados sendo alcançados a longo prazo (Gjedrem; Rye, 2018). Os peixes possuem várias características que os tornam modelos em programas de melhoramento genético, como fecundação externa, possibilitando o manuseio dos gametas; alta fecundidade, produzindo um grande número de descendentes e possibilidade de formação de híbridos (May et al., 2025). A tilápia ainda possui outras características como a maturidade sexual precoce e desova parcelada, que ocorre em vários meses do ano. Contudo, o controle reprodutivo é um dos maiores desafios na tilapicultura (Turra et al., 2010).

Assim, programas de melhoramento eficientes são cruciais para o desenvolvimento da tilapicultura, não só para atender à crescente demanda mundial por pescado, mas também para reduzir os custos de produção, melhorar a resistência a doenças, melhorar o aproveitamento alimentar e a qualidade dos produtos (Peterson et al., 2020; Barriá et al., 2021).

No Brasil, apesar da prática de cruzamentos de tilápias de diferentes espécies ocorrer há muito tempo, os programas de melhoramento genético começaram apenas no ano de 2005. Antes de 2005, o Brasil importava a espécie melhorada de outros países, porém, essas espécies eram adaptadas para os ambientes e condições desses países (Silva et al., 2015).

A aplicação de conhecimentos genéticos na piscicultura pode contribuir em diferentes aspectos, como na produção de alevinos, na sanidade, na conservação e uso de recursos genéticos, e no emprego da biotecnologia. Nesse sentido, animais com melhores características genômicas, principalmente relacionadas a tolerância a estresses bióticos ou abióticos e alto desempenho zootécnico podem ser selecionados para a proliferação (Hiltsdorf; Moreira; Freitas, 2015).

Entretanto, a seleção genômica pode acarretar efeitos adversos, uma vez que ganhos produtivos podem estar associados à redução de características ligadas à aptidão biológica (Misztal; Lourenco, 2024). Esse cenário pode ser explicado por fatores como correlações genéticas desfavoráveis entre características, menor precisão na avaliação de atributos de aptidão e intensificação do antagonismo genético, decorrente de alterações na herdabilidade e da aceleração do ciclo reprodutivo (Misztal; Lourenco, 2024). Além disso, a redução do intervalo de gerações tendem a elevar os níveis de endogamia nas populações (Lozada-Soto et al., 2022), o que pode resultar em depressão endogâmica e diminuição da variabilidade genética (D'Ambrosio et al., 2019).

A endogamia é o cruzamento de indivíduos com algum grau de parentesco genético, podendo ser pai, filho, primo, etc. Quando parentes se reproduzem, a chance de que ambos carreguem o mesmo alelo recessivo raro herdado de um ancestral comum é muito maior, podendo gerar proles defeituosa ou com características desfavoráveis para produção, como menor resistência a doenças e menor taxa de crescimento. Diante disso, torna-se fundamental assegurar que o aumento da produtividade não comprometa a diversidade genética nem seja prejudicado por correlações negativas entre características (Lozada-Soto et al., 2025).

Nesse contexto, o uso de sêmen criopreservado surge como uma ferramenta estratégica, oferecendo armazenamento de longo prazo e baixo custo, além de ampliar a flexibilidade no manejo dos programas de melhoramento. A disponibilidade de sêmen criopreservado acelera programas de reprodução, como a produção e disseminação de espécies melhoradas e com melhores características para produção. Além disso, o sêmen de genótipos específicos desejáveis pode ser preservado para criar estoques monosexuais (Lende et al., 1998).

A criopreservação de sêmen não permite apenas ganhos produtivos, mas também o aprimoramento de avaliações genômicas, a ampliação da diversidade genética e até a recuperação de linhagens ou populações (Blackburn; Wilson; Krehbiel, 2019). Lozada-Soto et al. (2025) afirmam que existe uma carência de conhecimento técnico para empregar a criopreservação em larga escala em todo o setor aquático.

Nesse estudo, será utilizada tilápias da variedade genética denominada UFLA. Na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, desde o início da década de 70, essa variedade é mantida sob acasalamento ao acaso e sem seleção, já adaptada à região, é formada a partir de tilápias nilóticas de diferentes origens, principalmente da variedade Bouaké, originária da Costa do Marfim na África, e introduzida no Brasil em 1971 (Freto, 2009). Em pesquisas observadas esta variedade apresentou grande potencial de crescimento e ganho de peso quando cultivada em tanques-rede (Freto, 2009).

A qualidade seminal de tilápias da variedade UFLA já foi avaliado por Souza et al. (2018) principalmente para gerar dados para serem aplicados em programas de melhoramento dessa variedade. Os autores verificaram boa qualidade seminal, principalmente quando os animais recebem indução hormonal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar a qualidade espermática após a técnica de armazenamento em ultracongelador (-80 °C) para o sêmen de *Oreochromis niloticus*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a qualidade do sêmen fresco de tilápia-do-Nilo;
- b) Realizar o armazenamento dos espermatozoides congelados em ultracongelador e avaliar a qualidade espermática pós armazenamento;
- c) Comparar a qualidade espermática após descongelamento do sêmen armazenado em ultracongelador e em botijão de nitrogênio líquido.

4 MATERIAIS 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. Protocolada sob o CEUA nº 5006160224.

4.2 Animais e estrutura

O experimento foi realizado no Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante a estação de desova da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os machos sexualmente maduros de tilápia, com peso médio de $0,932 \pm 0,07$ kg, que estavam previamente alocados em um tanque de alvenaria sob condições ambientais de temperatura e iluminação natural, alimentados com ração extrusada específica para reprodutores (36% PB) e fornecida uma vez ao dia (1% do peso corporal por dia) foram capturados com rede de arrasto e mantidos em caixas de 500 litros.

4.3 Colheita do sêmen

Os machos de tilápia foram capturados com pulcá contidos com uma toalha seca e limpa. Foi realizada a limpeza e secagem total da área genital para evitar a contaminação e ativação espermática com fezes, urina ou água doce. Foi realizada uma leve pressão no abdômen no sentido craniocaudal para obtenção do sêmen (Navarro *et al.*, 2014).

O sêmen de cada macho foi coletado em tubo ependorf e mantidos a 4 °C até a análise da motilidade espermática. A média do volume seminal apresentado pelos peixes foi de $0,7 \pm 0,3$ ml.

4.4 Análise do sêmen fresco

A taxa e duração da motilidade espermática foram verificadas em uma alíquota de 10 µL de sêmen em lâmina histológica, previamente ativado com água na proporção de 1:4 (sêmen: água) visualizados em microscópio no aumento de 400 x. Esta avaliação foi realizada de forma

subjetiva por avaliador experiente e com 8 repetições. A duração da motilidade foi registrada desde a ativação até que os espermatozoides se encontrassem imóveis.

Sêmen com motilidade superior a 80% foram separados para o processo de armazenamento e criopreservação, totalizando 24 machos que atenderam esse critério. Por outro lado, sêmen que apresentaram contaminação com fezes, urina ou sangue ou com ativação prévia foram descartados (Navarro *et al.*, 2014).

Para análise de vigor foram considerados os movimentos dos espermatozoides, sendo classificados em 5 scores: Score 5 - movimento retilíneo e progressivo muito rápido; Score 4 - movimento progressivo retilíneo rápido; Score 3 - movimento intermediário; Score 2 - movimento lento; Score 1 - movimento oscilatório; e ausência de movimento.

A avaliação de integridade de membrana foi realizada pela técnica de coloração eosina-nigrosina. As amostras foram misturadas em volumes iguais de sêmen e solução de corante. Uma gota da amostra de sêmen e uma gota de solução de eosina-nigrosina (2 µL de espermatozoides; 4 µL de nigrosina-eosina) foram adicionadas à lâmina e realizado o esfregaço. Os esfregaços foram secos ao ar e examinados diretamente. Foram avaliados 200 espermatozoides sob um microscópio de luz (Eclipse E200, Nikon, Tóquio, Japão), com ampliação de 400x. Os espermatozoides brancos (não corados) foram classificados como vivos e aqueles com cabeças rosa ou vermelhas foram classificados como mortos. A integridade da membrana foi calculada em porcentagem de células não coradas, representando espermatozoides com uma membrana intacta, sendo o resultado dado pela fórmula: integridade da membrana (%) = (número de células não coradas/200 células contadas) × 100 (Oliveira *et al.*, 2022).

Para a concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução salina tamponada com formaldeído na proporção de 10:990, em tubo tipo eppendorf, a solução foi homogeneizada e utilizada para preenchimento da câmara de Neubauer por capilaridade para contagem de espermatozoides e avaliação da concentração espermática (Galo *et al.*, 2018). A avaliação foi realizada em microscópio óptico e a concentração espermática estimada pela fórmula:

$CE = N \times FC$; em que:

CE é a concentração espermática (espermatozoides por mm³);

N é o número de células contadas na câmara de Neubauer.

O fator de correção (FC) é dado por:

$FC = (q \times fd) / d$; em que:

q = 5, e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de Neubauer (25) e o número de quadrículos contados (5);

fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen (= 104);

d é a profundidade entre a lamínula e a câmara de Neubauer (= 0,1 mm).

Para a análise morfológica dos espermatozoides, as amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 1:1000 em solução de formol-citrato (2,9% de citrato de sódio, 4% de solução comercial de formaldeído a 35% e água destilada; Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, Brasil). A amostra diluída foi corada com Rosa de Bengala a 4% (3:20; corante: espermatozoide). Cada amostra foi observada em microscópio óptico (Olympus® CX22LED, Tóquio, Japão) com aumento de 1000 $\times$ e a morfologia de 200 espermatozoides foi avaliada. Foram consideradas as seguintes anormalidades: Cabeça degenerada, Peça intermediária degenerada, Cauda quebrada, Cauda fraturada, Cauda fortemente enrolada, Cabeça isolada, Cauda levemente dobrada, Gota proximal e Gota distal (Miliorini *et al.*, 2011). Os dados foram registrados como a porcentagem de espermatozoides anormais.

4.5 Protocolo de congelamento do sêmen

As amostras de sêmen que apresentaram motilidade espermática superior à 80% (n=24) foram separadas para serem utilizadas no congelamento. Foi realizado pool com sêmen, utilizando três machos para cada pool, gerando 8 pools para serem diluídos. Cada pool foi diluído com diluente iônico contendo glicose 350 mM, Tris 30 mM e dimetilacetamida (DMA) a 10%, na proporção de 1:3 (sêmen: diluente) (Bozkurt; Yavaş, 2016).

O pool de sêmen diluído foi equilibrado a 4 °C por 10 minutos e colocado em palhetas de 0,5 ml. Para cada pool diluído foram envasadas 4 palhetas, totalizando 32 amostras, que foram alocadas em vapor de nitrogênio líquido (-40 °C) por 10 minutos. Depois disso, metade das palhetas (n=16) congeladas foram mantidas no nitrogênio líquido (-196 °C), e a outra metade (n=16) foi mantida em ultracongelador (-80 °C).

4.6 Descongelamento do sêmen e análises pós descongelamento

Após 30 dias de congelamento, as palhetas foram retiradas individualmente do botijão de nitrogênio líquido e do ultracongelador e imediatamente imersa em banho-maria, a 30 °C por 30 segundos (Bozkurt; Yavaş, 2016). Foram realizadas as seguintes análises: taxa e duração da motilidade espermática, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática e estresse oxidativo foram verificados através da mesma metodologia empregada

para o sêmen fresco. Vale ressaltar que para cada pool e tratamento as análises foram realizadas em duplicata.

4.7 Estresse oxidativo

As palhetas foram descongeladas em uma caixa de poliestireno contendo gelo picado (5 ± 2 °C) e as análises foram realizadas no esperma total (o plasma seminal não foi separado). Os resultados foram normalizados para o conteúdo total de proteína, determinado pelo método de Bradford (1976).

Para a peroxidação lipídica (PL), a concentração de malondialdeído foi analisada utilizando kit QuantiChrom™ TBARS Assay (DTBA-100) (BioAssay Systems, Hayward, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A absorbância foi medida a 535 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA), conforme descrito por Motta *et al.* (2022).

A avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) no sêmen foi determinada com base na auto-oxidação do pirogalol pelos métodos de Madesh e Balasubramanian (1997). As amostras (30 µL) foram diluídas em 99 µL de solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), e foram adicionados 6 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 15 µL de pirogalol 1,25 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A absorbância foi lida usando um leitor de microplacas a 570 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA). A atividade total da SOD foi expressa em unidades por miligrama 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.

A atividade da catalase (CAT) foi medida de acordo com Aebi (1984). A atividade enzimática foi determinada pelo consumo de H_2O_2 , observado como a diminuição da absorbância a 240 nm durante 60 s. Uma solução de substrato de 0,03% (p/p) de peróxido de hidrogênio foi preparada em tampão fosfato 50 mM a pH 7,2 e 25 °C, utilizando peróxido de hidrogênio (30% (p/p) da Sigma-Aldrich, Alemanha). Resumidamente, 3 µL de esperma foram adicionados a uma microplaca e, em seguida, 297 µL da solução de substrato foram adicionados. As amostras foram analisadas em um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA). A variação da absorbância no tempo zero e após 60 s foi estimada e a velocidade da reação foi determinada utilizando um coeficiente de extinção de H_2O_2 de $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade específica da CAT foi relatada em unidades por miligrama de proteína (uma unidade é definida como 1 pmol de H_2O_2 consumido por minuto).

4.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk e para diferentes escalas de significância usando ANOVA, seguido pelo teste apropriado de acordo com os resultados obtidos. As análises estatísticas foram conduzidas usando o software R, e o nível de significância para todos os testes estatísticos foi definida como 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada amostra de sêmen foi avaliada individualmente, as características avaliadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características do sêmen fresco de tilápias (n=24).

Parâmetro avaliado	Valores
Motilidade (%)	85±0,05
Duração (s)	725,06±102,8
Vigor	4,63±0,5
Integridade (%)	76,0±7,36
Concentração (x 10 ⁷)	24,61±42,49

Fonte: elaboração própria.

A motilidade média observada foi de 85%, esses valores estão dentro do recomendado por Felizardo *et al.* (2016), do qual recomendam uma motilidade espermática de pelo menos 80% para submeter o sêmen ao processo de criopreservação, tendo em vista que esse processo diminui sua qualidade no pós descongelamento.

A duração da motilidade verificada, está superior à encontrada por Souza *et al.* (2018) para tilápias oriundas do mesmo local onde esse estudo foi realizado, de 288 segundos, essa diferença entre as avaliações pode ser devido ao momento em que se parou a observação da taxa da motilidade, tendo em vista que nesse estudo a motilidade foi observada até que todos espermatozoides estivessem parados, enquanto Souza *et al.* (2018) pararam a observação quando apresentava 10% de motilidade.

O vigor espermático observado é considerado excelente, pois o vigor com score entre 4 e 5 apresentam movimento retilíneo e progressivo rápido. Essa avaliação é importante para determinar a capacidade de fertilização do sêmen, pois ela evidencia se o espermatozoide tem energia metabólica necessária para alcançar e fertilizar o óvulo (Pereira *et al.*, 2016).

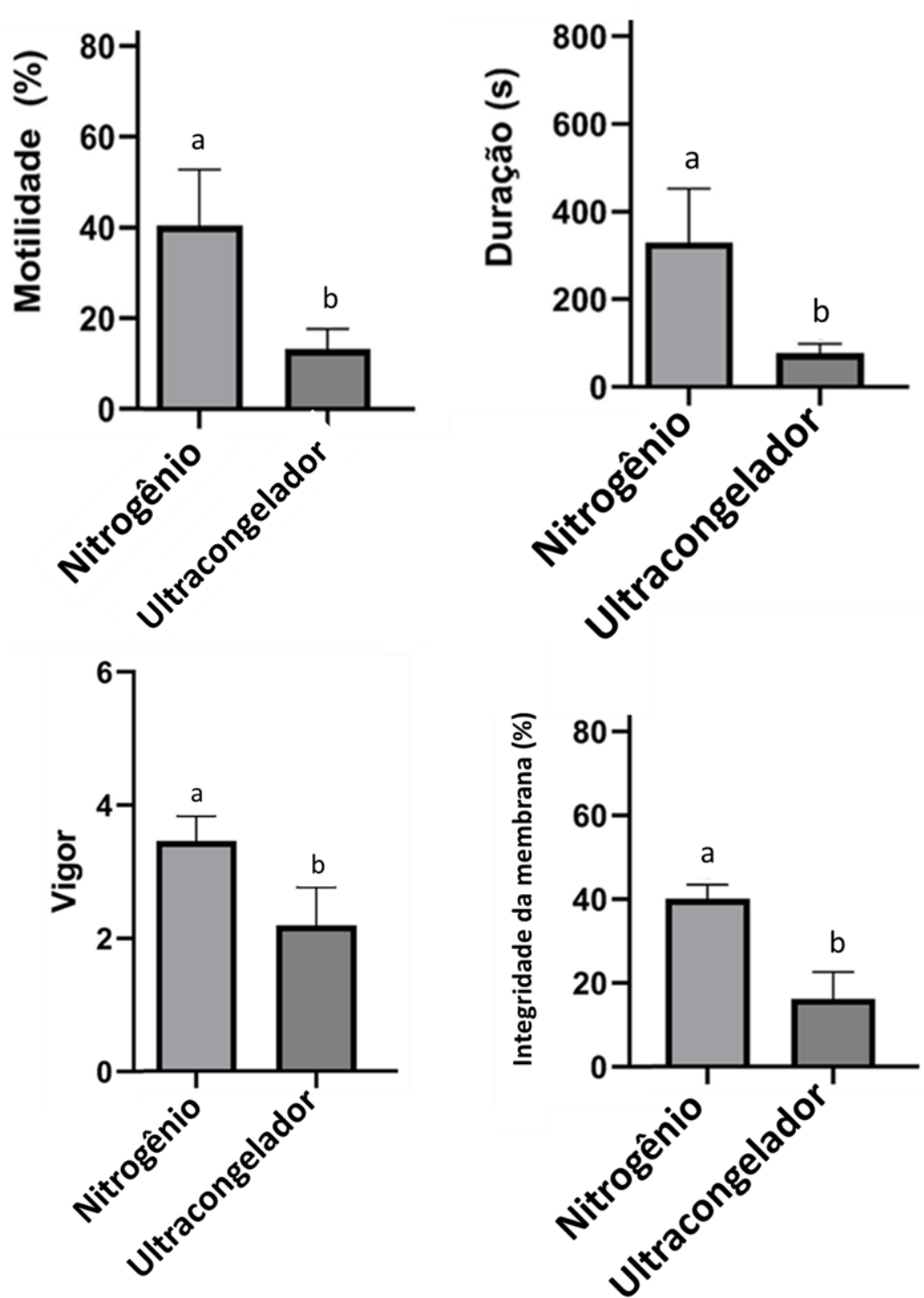
A porcentagem de integridade de membrana do sêmen fresco está abaixo do relatado por Gurgel-Neto *et al.* (2015), do qual indicam uma porcentagem superior a 90% para o sêmen de tilápia. Além disso, também já é sabido que o processo de criopreservação causa danos na membrana, diminuído assim sua viabilidade, portanto, quanto maior a integridade da membrana espermática, maior será sua viabilidade após descongelamento (Neyrão, 2022).

Em relação à concentração espermática verificada ($2,46 \pm 4,24 \times 10^8$ espermatozoide/ml), está dentro de valores observados por outros autores. Vale ressaltar que esse parâmetro pode ser bem variado para essa espécie, do qual foram registrados valores que podem ir de $5,73 \times 10^5$ espermatozoide/ml (Souza *et al.*, 2018) à $2,44 \pm 0,4 \times 10^9$ espermatozoide/ml (Paulino *et al.*, 2016), essa diferença é devido a vários fatores como estado nutricional, peso do animal, temperatura, manejo e até mesmo indução hormonal (Paulino *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2018).

De acordo com Paula *et al.* (2022), a determinação prévia da qualidade do sêmen garante um protocolo eficaz e confiável que pode ser replicado e possivelmente validado por outros pesquisadores, evitando comprometer os resultados. Assim, as características espermáticas apresentadas pelo sêmen fresco neste estudo garantem a validade do nosso protocolo.

Na análise seminal após descongelamento, amostras de sêmen criopreservadas em nitrogênio líquido apresentaram valores superiores para vigor, taxa e duração da motilidade espermática e integridade de membrana em relação ao sêmen armazenado em ultracongelador ($P < 0,05$) (Figura 2).

Figura 2 - Parâmetros qualitativos seminal, sêmen congelado em nitrogênio líquido e em Ultracongelador.



Fonte: dados da autora.

As características qualitativas do sêmen encontradas são superiores às verificadas por Navarro e Borges Corrêa (2024) para sêmen dessa espécie, criopreservado com DMA, do qual verificaram as seguintes características: taxa de motilidade média de 3,8% em sêmen

criopreservado com a utilização do diluidor DMA, duração da motilidade de 106,8 segundos e vigor de 1,5.

Godinho, Amorim e Peixoto (2003) utilizando DMSO no congelamento de sêmen de tilápia, registraram motilidade máxima de 35%, bem próxima a verificada nesse estudo para o sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. Porém, Bozkurt e Yavaş (2016) utilizando o mesmo diluidor e condições de descongelamento desse estudo verificaram taxa de motilidade média de 60% para o sêmen de tilápia, por isso foi determinada essa metodologia para essa pesquisa.

Para espécies de peixes reofílicas, Viveiros e Godinho (2009) em uma revisão sobre parâmetros de motilidade de sêmen pós descongelamento, verificaram taxa de motilidade de até 60% para a maioria das espécies, embora os autores não citaram qual seria a motilidade mínima desejada para se utilizar em fertilização, acredita-se que motilidade mínima de 30% seria suficiente para fertilização artificial, principalmente em programas de melhoramento genético. Além disso, ao se utilizar sêmen congelado, é indicado a utilização de uma dose maior em relação ao sêmen fresco, devido principalmente à diminuição das características seminais no processo de congelamento (Viveiros; Godinho, 2009).

Alguns fatores como o manejo podem influenciar nesses resultados, como o processo de descongelamento, do qual nesse estudo foi utilizado banho-maria a 30 °C por 30 segundos, Paula *et al.* (2022) utilizaram 30 °C por 16 segundos para o descongelamento das palhetas armazenadas em ultracongelador para o sêmen de curimba. Já Bozkurt *et al.* (2019) utilizaram 30 °C por 20 segundos para o sêmen de tilápia, porém esses autores utilizaram palhetas de 0,250 ml, ou seja, a metade do volume que foi utilizado nesse estudo.

A solução diluidora utilizada também é um fator importante, nesse estudo foi utilizado glicose 350 mM, Tris 30 mM e dimetilacetamida (DMA) a 10%. O DMA penetra na célula e ajuda a prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares e também reduz o ponto de congelamento da solução, protegendo a célula contra os efeitos da desidratação e do choque osmótico durante o congelamento e o descongelamento. Já a glicose atua como uma fonte de energia para os espermatozoides após o descongelamento, ajudando a restaurar o movimento (Bozkurt; Yavaş, 2016). O Tris tem por função manter o pH estável da solução durante o processo de criopreservação. A manutenção do pH é vital, pois as mudanças extremas de acidez ou alcalinidade podem desativar enzimas celulares e danificar a membrana espermática (Bozkurt *et al.*, 2019).

Por outro lado, a diferença entre a qualidade seminal pós descongelamento do sêmen armazenado no nitrogênio líquido e no ultracongelador pode ser devido ao tempo de

armazenamento. De acordo com um estudo realizado por Paula *et al.* (2022) com sêmen armazenado em ultracongelador de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando diluidor DMSO 10%, a qualidade do sêmen diminuiu significativamente após a segunda semana de armazenamento, e essa queda continuou gradativa com o passar do tempo. No presente estudo, o descongelamento foi realizado após 30 dias do congelamento, as palhetas foram retiradas individualmente do botijão de nitrogênio líquido e do ultracongelador e imediatamente imersa em banho-maria, a 30 °C por 30 segundos (Bozkurt; Yavaş, 2016).

Um outro estudo que armazenou o sêmen de carpa (*Carassius auratus*) em ultrafreezer e descongelou em 24 horas, apontou que a atividade espermática de sêmen criopreservado em nitrogênio líquido foi significativamente maior do que a preservada pelo ultracongelador (-80 °C), indicando que o ultracongelador não pode substituir o nitrogênio líquido na criopreservação (Shi *et al.*, 2025). Esses autores testaram diferentes soluções diluidoras (glicerol, dimetilsulfóxido - DMSO, metanol - MeOH e etilenoglicol - EG) e somente o sêmen diluído e armazenado com DMSO 15% apresentou motilidade de até 20% após 24 horas. Por outro lado, Bozkurt *et al.* (2019) não recomendaram a utilização de DMSO para criopreservação do sêmen de tilápia.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) também têm sido apontadas como uma das principais causas da deterioração da integridade e funcionalidade dos espermatozoides de peixes durante a criopreservação. O alto teor de ácidos graxos insaturados nas células espermáticas e a baixa capacidade antioxidante do sêmen diluído são fatores-chave que tornam os espermatozoides suscetíveis aos ataques de EROs, o que afeta a motilidade após descongelamento (Sandoval-Vargas *et al.*, 2021).

Adicionalmente, a verificação da integridade da membrana plasmática é outro parâmetro importante, tendo em vista que durante o processo de congelamento seminal, a formação de cristais de gelo ou outros fatores podem danificar as células espermáticas, levando ao rompimento de sua membrana plasmática e, conseqüentemente, à sua morte/lise (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). Conforme pode ser observado nesse estudo, a integridade da membrana plasmática do sêmen armazenado em ultracongelador foi bem inferior ao sêmen fresco e criopreservado, demonstrando que esse processo pode ocasionar maiores danos a membrana plasmática.

As discrepâncias em vários estudos podem ser atribuídas às diferenças nas características fisiológicas dos espermatozoides de espécies específicas, às composições dos diluentes e das soluções de criopreservação, etc. Geralmente, a criopreservação de espermatozoides pode causar danos às células devido aos cristais de gelo formados durante o

processo de resfriamento e congelamento, o que afeta a membrana plasmática, as mitocôndrias e a estrutura da cromatina (Cabrita *et al.*, 2010). Quando a temperatura de armazenamento é inferior a $-132\text{ }^{\circ}\text{C}$, a solução aquosa celular encontra-se em um estado vítreo. No entanto, quando a temperatura de armazenamento é de aproximadamente $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, formam-se cristais de gelo maiores, que podem causar danos irreversíveis ao citoesqueleto e a outras estruturas dentro da célula, influenciando negativamente a atividade espermática (Paula *et al.*, 2022). Isso pode explicar a atividade espermática significativamente reduzida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em comparação com a observada em nitrogênio líquido no presente estudo.

Shi *et al.* (2025) ressaltam que na prática, nenhum padrão unificado para soluções diluidoras de esperma de peixe foi identificado para as diferentes espécies de peixes, e os tipos e concentrações de diluidores de esperma devem ser selecionados com base nas características do esperma de diferentes espécies de peixes. Assim, esse estudo apresenta evidências para direcionar futuros estudos de armazenamento de sêmen dessa espécie em ultracongelador e em nitrogênio líquido.

Não foi observada nenhuma diferença ($P>0,01$) nas alterações morfológicas avaliadas nos espermatozoides congelados no nitrogênio líquido e no ultracongelador. Contudo, a porcentagem de espermatozoides normais foi maior no sêmen criopreservado em nitrogênio líquido ($38,4 \pm 12,9\%$) em relação ao armazenado em ultracongelador ($29,2 \pm 9,0\%$). As alterações mais frequentes foram cabeça isolada e cauda levemente dobrada, que apresentaram porcentagem acima de 20% (Tabela 2).

Tabela 2 - Alterações morfológicas dos espermatozoides e estresse oxidativo após descongelamento do sêmen de tilápias. (Continua)

	Tratamento	
	N ₂ líquido	Ultracongelador
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS		
Cabeça degenerada (%)	$3,4 \pm 2,6$	$4,8 \pm 3,1$
Peça intermediária degenerada (%)	$2,7 \pm 2,0$	$3,8 \pm 2,3$
Cauda quebrada (%)	$1,5 \pm 0,7$	$2,2 \pm 0,7$
Cauda fraturada (%)	$3,0 \pm 1,3$	$3,0 \pm 2,1$
Cauda fortemente enrolada (%)	$4,8 \pm 1,7$	$5,3 \pm 2,1$
Cabeça livre (%)	$23,3 \pm 6,6$	$28,3 \pm 5,9$
Cauda levemente dobrada (%)	$22,4 \pm 5,0$	$29,0 \pm 13,0$
Gota proximal (%)	$0,4 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,5$
Gota distal (%)	$0,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,3$
Normal (%)	$38,4 \pm 12,9^*$	$29,2 \pm 9,0$

Tabela 2 - Alterações morfológicas dos espermatozoides e estresse oxidativo após descongelamento do sêmen de tilápias. (Conclusão)

	Tratamento	
	N ₂ líquido	Ultracongelador
ESTRESSE OXIDATIVO		
PL (nmol MDA ¹ /mg de proteína)	0,49 ± 0,05	0,48 ± 0,07
SOD (U SOD/mg de proteína)	1,76 ± 0,50	1,70 ± 0,43
CAT (U CAT/mg de proteína)	5,26 ± 2,29	3,06 ± 2,10

Fonte: elaboração própria.

PL - Peroxidação lipídica; SOD - Superóxido Dismutase; CAT - Catalase.

¹ Malondialdeído. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para PL, SOD e CAT ($P > 0,05$; teste t).

* Diferença significativa a 5% pelo teste t. n = 8 pools de espermatozoides.

Segundo Herman *et al.* (1994), as alterações espermáticas primárias como calda dobrada e cabeça isolada ocorrem durante a espermatogênese devido a alguns fatores que podem afetar o reprodutor, como enfermidades, restrição alimentar e estresse ambiental. Assim, as alterações que mais se destacaram nesse estudo provavelmente não foram ocasionadas em decorrência dos procedimentos e tratamentos aplicados, possivelmente alguns fatores referentes aos reprodutores contribuíram para esse resultado.

Embora nesse estudo não tenha sido realizado a análise morfológica do sêmen fresco para verificar a porcentagem de espermatozoides normais, alguns autores relatam que o resultado desse parâmetro pode ser bem variado, do qual Mataveli *et al.* (2010) registraram média de 16% e Navarro e Borges Corrêa (2024) verificaram média de 74% de células normais no sêmen fresco para a espécie. Miliorini *et al.* (2011) recomendam um mínimo de 50% de espermatozoides normais em fertilização artificial de *Prochilodus lineatus*. Contudo para sêmen criopreservado de tilápia não há relatos dos valores mínimos de espermatozoides normais.

Navarro e Borges Corrêa (2024) afirmam que o processo de criopreservação afeta a morfologia dos espermatozoides de tilápia, dos quais observaram que a porcentagem de espermatozoides normais após o processo de criopreservação foi de aproximadamente 54%. Esses autores ainda verificaram que uma das principais anormalidades do espermatozoide após descongelamento foi a cabeça isolada, com média de 12% no sêmen criopreservado com DMA 10%.

A análise da morfologia espermática é um dos critérios essenciais para a avaliação da qualidade do sêmen e, conseqüentemente, da viabilidade reprodutiva. Alterações morfológicas nos espermatozoides de peixes são críticas porque podem reduzir significativamente a sua motilidade (capacidade de nadar), o que afeta diretamente a capacidade de fertilização (Neyrão,

2022), o que pode também justificar a diminuição da viabilidade do sêmen após os processos de congelamento empregados. Felizardo *et al.* (2010) ressaltam que anomalias de sêmen acima de 30% já causa a diminuição da taxa de motilidade espermática.

As demais alterações morfológicas de cauda, cabeça, peça intermediária e gota apresentaram frequência média inferiores a 5,5%. Porém, é de suma importância sua avaliação, pois anormalidades nessas partes afetam diretamente a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Em relação à peça intermediária o principal dano ocorre ao nível mitocondrial, onde a ruptura da membrana da mitocôndria leva à liberação de componentes mitocondriais, resultando na inativação de enzimas que estão relacionadas a produção de energia para a motilidade espermática (Sandoval-Vargas *et al.*, 2021). Além disso, danos à membrana mitocondrial prejudica a eficiência respiratória por promover a liberação de ERO's que aumenta o estresse oxidativo sofrido pelos espermatozoides (Cabrita *et al.*, 2014).

Por sua vez, os danos que ocorrem na cauda estão relacionados a mudanças no perfil das proteínas flagelares e alterações causados por danos mecânicos, gerando distúrbios de motilidade que afetam a capacidade de fertilização do espermatozoide (Xin *et al.*, 2020).

Já as gotas citoplasmáticas em espermatozoides de peixes são pequenos resíduos de citoplasma que não foram totalmente eliminados durante a maturação final do espermatozoide. A presença dessas gotas pode afetar negativamente a qualidade e a função do sêmen. O efeito é determinado principalmente pela localização da gota (proximal ou distal). A gota proximal está localizada perto da cabeça do espermatozoide, na região do colo (junto ao flagelo) e pode afetar a Motilidade e vigor, diminuindo a chance de alcançar o óvulo. A gota distal está localizada na cauda, mais distante da cabeça, e também pode afetar a motilidade, embora com menos impacto do que a gota proximal. A gota distal torna o espermatozoide mais suscetível a danos durante o processamento do sêmen (como a diluição ou criopreservação), aumentando a fragilidade da cauda (Cabrita *et al.*, 2010; Cabrita *et al.*, 2013).

No que se refere ao estresse oxidativo não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para os parâmetros PL, SOD e catalase para os tratamentos empregados no armazenamento de sêmen de tilápia (Tabela 2).

Em relação aos valores de PL, não foram encontrados na literatura nenhuma pesquisa que relatasse os valores em nmol MDA/mg de proteína em sêmen de tilápia seja fresco ou criopreservado. Para curimba, Motta *et al.* (2022) registraram PL média de 2,12 μM de MDA, e CAT 3,24 U CAT/mg de proteína, Martinez-Páramo *et al.* (2012) observaram aumento na peroxidação lipídica no sêmen pós descongelamento de robalo ($2,4 \pm 0,4$ para $4,0 \pm 0,4$ μmoles de MDA/mil spz. Esses valores foram considerados altos pelos autores, porém, no estudo de

Motta *et al.* (2022) os valores de PL foram bem inferiores e de CAT superiores em relação ao, o que pode sugerir uma alta eficiência da CAT, visto que a catalase tem uma função importante na degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, prevenindo danos causados por radicais hidroxila (Félix; Oliveira; Cabrita, 2020). Além disso, essa enzima foi identificada como um importante antioxidante para peixes (Egger *et al.*, 2021).

Um estudo de Marwa *et al.* (2025) registraram valores de CAT e SOD para o sêmen fresco de tilápia de 32,67 U ml⁻¹ e 40,00 U ml⁻¹, respectivamente. Observa-se que esses valores são bem superiores aos verificados nesse estudo, porém a metodologia de avaliação foi diferente, tendo em vista que o sêmen congelado foi previamente diluído, não sendo recomendado nesse caso realizar a avaliação por ml de sêmen, assim, foi utilizado U/mg de proteína, conforme realizado por Motta *et al.* (2022) em sêmen criopreservado.

Existem relatos que o processo de criopreservação aumenta o estresse oxidativo em sêmen de peixes (Cabrita *et al.*, 2014). Em espécies aquáticas, fatores ambientais como alterações na temperatura, nos níveis de oxigênio e na salinidade, além da exposição a metais de transição (como ferro, cobre, cromo e mercúrio) ou pesticidas (como inseticidas, herbicidas, fungicidas, petróleo e poluentes relacionados) podem induzir estresse oxidativo (Cabrita *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo, resultante de um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e defesas antioxidantes, impacta negativamente a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA dos espermatozoides (Cabrita *et al.*, 2014). A Peroxidação Lipídica (PL) atua no sêmen de peixes como um processo de dano oxidativo que compromete a integridade e a função dos espermatozoides, sendo uma das principais causas de perda de qualidade durante o manejo *in vitro*.

O espermatozoide é particularmente suscetível à PL devido a duas características principais: Alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana plasmática e mitocôndrias dos espermatozoides. As duplas ligações químicas nesses ácidos graxos são o alvo primário dos radicais livres (Gualtieri *et al.*, 2021). O outro motivo é a baixa concentração de antioxidantes citoplasmáticos, pois durante a maturação, o espermatozoide elimina a maior parte do seu citoplasma, o que significa que ele tem poucas enzimas e moléculas antioxidantes para se defender do estresse oxidativo externo (Costa; Streit Jr, 2019).

O processo de PL começa quando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como o radical superóxido ou peróxido de hidrogênio atacam os PUFAs, iniciando uma reação em cadeia que resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos (El-Beltagi; Mohamed, 2013). A ocorrência da peroxidação lipídica leva a danos significativos, afetando diretamente a

capacidade reprodutiva do sêmen por meio de dano à integridade da membrana, perda de motilidade e vigor e o dano oxidativo afeta as proteínas e os receptores essenciais na cabeça do espermatozoide (Onur Yaman; Ayhanci, 2021), comprometendo sua capacidade de ativar a motilidade em meio aquático e de reconhecer e penetrar o óvulo.

No manejo *in vitro* de sêmen de peixes, a PL é frequentemente acelerada por exposição ao oxigênio e luz durante a coleta e manipulação, contaminação por metais como o ferro e a diluição e criopreservação, do qual o estresse térmico e osmótico desses processos aumenta drasticamente a produção de EROs, tornando a PL o principal mecanismo de dano no sêmen criopreservado. As enzimas antioxidantes CAT e SOD desempenham papéis fundamentais na neutralização do dano oxidativo, e têm sido associadas ao mecanismo de defesa contra a peroxidação lipídica mantendo assim a estrutura e a funcionalidade dos espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2014).

Para avaliação da qualidade do esperma após o descongelamento, pesquisas sobre análise do estresse oxidativo têm sido utilizadas para complementar a análise da cinética espermática e integridade da membrana e morfologia espermática (Motta *et al.*, 2022). Embora os sistemas biológicos possuam agentes antioxidantes protetores, a defesa antioxidante do sêmen e dos espermatozoides de peixes é insuficiente durante a criopreservação devido à baixa quantidade de antioxidantes após a diluição do sêmen no diluente de criopreservação (Cabrita *et al.*, 2011; Martínez-Páramo *et al.*, 2012).

Diante do exposto, acredita-se que a solução utilizada nesse estudo tenha contribuído para preservação dos espermatozoides dos danos oxidativos, não sendo esse um dos fatores que contribuiu para a diminuição da viabilidade seminal após o descongelamento em ambos tratamentos aplicados.

6 CONCLUSÕES

Observou-se que ambos os processos de congelamento do sêmen de tilápia afetaram a qualidade do sêmen após descongelamento. Porém, amostras de sêmen criopreservadas em nitrogênio líquido apresentaram valores superiores para vigor, taxa e duração da motilidade espermática e integridade de membrana em relação ao sêmen armazenado em ultracongelador.

Não foi observada nenhuma diferença nas alterações morfológicas avaliadas nos espermatozoides congelados no nitrogênio líquido e no ultracongelador. Contudo, a porcentagem de espermatozoides normais foi maior no sêmen criopreservado em nitrogênio líquido.

Nenhum dos tratamentos empregados melhorou a resposta ao estresse oxidativo causado pelo processo de armazenamento de sêmen de tilápia.

Por fim, foi possível identificar viabilidade seminal no sêmen armazenado em ultracongelador por um período de um mês. Contudo, essa viabilidade foi significativamente diminuída com o processo. Portanto, recomenda-se que futuros estudos sejam realizados, principalmente testando tempos menores de armazenamento do sêmen de tilápia em ultracongelador.

Uma limitação encontrada na realização desse estudo foi não conseguir fêmeas aptas para a reprodução, não sendo possível testar o sêmen descongelado na fertilização de ovócitos viáveis. Esse teste não foi possível devido a inviabilidade dos ovos de fêmeas que foram selecionadas para a reprodução.

REFERÊNCIAS

- ABAHO, I. *et al.* Selective breeding for genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) in Uganda: current status, challenges, and future perspectives. **Animals**, v. 15, n. 2, p. 142, 2025.
- ABD EL-HACK, Mohamed E. *et al.* Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Biometeorology**, v. 66, n. 11, p. 2183-2194, 2022.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. In: AEBI, H. (Ed.). **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.
- AGARWAL, Ashok *et al.* Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014.
- ARUMUGAM, M. *et al.* Recent advances in tilapia production for sustainable developments in Indian aquaculture and its economic benefits. **Fishes**, v. 8, n. 4, p. 176, 2023.
- BABIAK, I. *et al.* Cryopreservation of sperm from asp *Aspius aspius*. **North American Journal of Aquaculture**, v. 60, n. 2, p. 146-148, 1998.
- BARRÍA, A. *et al.* Genomic selection and genome-wide association study for feed-efficiency traits in a farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) population. **Frontier Genetic**, v. 12, 737906. 2021.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. The energetics of fish sperm motility. In: GAGNON, C. (ed.). **Controls of Sperm Motility**. Boca Raton: CRC Press, 2020. p. 153-173.
- BILLARD, R. *et al.* **Biology of sperm and artificial reproduction in carp**. Aquaculture, v. 129, n. 1-4, p. 95-112, 1995.
- BLACKBURN, H. D.; WILSON, C. S.; KREHBIEL, B. Conservation and utilization of livestock genetic diversity in the United States of America through gene banking. **Diversity**, v. 11, 244, 2019.
- BOZKURT, Y. *et al.* Effect of different cryoprotectants (Glycerol, Methanol and Dimethyl Sulfoxide) on post-thaw quality, viability, fertilization ability and DNA damage of cryopreserved Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatozoa. **CryoLetters**, v. 40, n. 1, p. 11-17, 2019.
- BOZKURT, Y.; YAVAŞ, L. Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm. Marco-Jiménez, F. (Ed.). **Cryopreservation in Eukaryotes**. Intech, 2016. p. 75-90.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

- CABRITA, E. *et al.* Classification of sperm abnormalities in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using bright-field and differential interference contrast microscopy. **Aquaculture**, v. 414-415, p. 235-241, 2013.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. **Journal Applied Ichthyology**, v. 26, p. 623–635, 2010.
- CABRITA, E. *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, 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**, v. 125, n. 1-4, p. 189-195, 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.
- CARVALHO, A. F. S. *et al.* Canonical correlation analysis to identify the semen characteristics used to forecast the freeze survival of curimba (*Prochilodus lineatus*) spermatozoa. **Cryoletters**, v. 38, n. 4, p. 263-268, 2017.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.
- COSTA, B. B.; STREIT JR, D. P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 2, p. 93-109, 2019.
- D'AMBROSIO, J. *et al.* Genome- wide estimates of genetic diversity, inbreeding and effective size of experimental and commercial rainbow trout lines undergoing selective breeding. **Genetic Seletive and Evolution**, v. 51, p. 1–15, 2019.
- DAWALIBY, R. *et al.* A fosfatidiletanolamina é um regulador chave da fluidez da membrana em células eucarióticas. **Journal of Biology Chemetry**, v. 291, p. 3658–3667, 2016.
- DE BRITO ROMANZINI, G.; DA COSTA, C. P. Cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede: uma revisão de literatura. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 6, n. 13, p. 783–797, 2023.
- EGGER, R. C. *et al.* Sperm cryopreservation of *Prochilodus lineatus* throughout the same reproductive season. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 12, p. 6453–6463, 2021.
- EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44-57, 2013.
- EL-SAYED, Abdel-Fattah M. **Tilapia culture**. 2. ed. Academic press, 2019.

ENGEPESCA. **Tilápia**: pesquisadores descobrem na composição creatina, taurina e glutamato. 2022. Disponível em: <https://engepesca.com.br/post/tilapia-pesquisadores-descobrem-na-composicao-creatina-aurina-e-glutamato>. Acesso em: 22 Abr. 2025

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 636-643, 2010.

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.

FELIZARDO, V. O. *et al.* Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 259-263, 2010.

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

FREATO, T. A. **Interação entre variedade e plano nutricional em diferentes sistemas de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2009. 56 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

GALO, J. M. *et al.* Qualidade do semen fresco e criopreservado e sua influência nas taxas de fertilização, eclosão e qualidade das larvas de *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 438-445, 2018.

GJEDREM, T.; RYE, M. Selection response in fish and shellfish: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2018.

GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Cryopreservation of the semen of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: cryoprotectants, spermatozoa activating solutions and cryogenic refrigerator. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1537-1543, 2003.

GRACIA, L. F. G. **Alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes**. 2011. 18 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GUALTIERI, R. *et al.* Sperm oxidative stress during in vitro manipulation and its effects on sperm function and embryo development. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1025, 2021.

GURGEL-NETO, A. C. *et al.* Semen collection and analysis techniques in male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 445-450, 2015.

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. 4. ed. Danville, Illinois: Interstate Publishers. 1994.

HERRANZ-JUSDADO, J. G. *et al.* European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes. **Aquaculture**, v. 506, p. 42-50, 2019.

HERRERA, F.; BONDARENKO, O.; BORYSHPOLETS, S. Osmoregulation in fish sperm. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 785-795, 2021.

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.

HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; FREITAS, R. T. F. Desafios do melhoramento genético de organismos aquáticos. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 147, p. 36-43, 2015.

HOROKHOVATSKYI, Y. *et al.* Lipid composition in common carp (*Cyprinus carpio*) sperm possessing different cryoresistance. **Cryobiology**, v. 73, n. 2, p. 282-285, 2016.

JUDYCKA, S. *et al.* Standardized cryopreservation protocol of European perch (*Perca fluviatilis*) semen allows to obtain high fertilization rates with the use of frozen/thawed semen. **Aquaculture**, v. 498, p. 208-216, 2019.

KHAW, H. L.; PONZONI, R. W.; DANTING, M. J. C. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. **Aquaculture**, v. 275, n. 1-4, p. 64-69, 2008.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. **Aquaculture Research**, v. 27, n. 9, p. 659-671, 1996.

LEGENDRE, M. *et al.* Adaptations of semen characteristics and sperm motility to harsh salinity: Extreme situations encountered by the euryhaline tilapia *Sarotherodon melanotheron heudelotii* (Dumeril, 1859). **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1251-1267, 2016.

LENDE, T.; KOMEN, J.; BRASCAMP, E.W. The role of reproductive techniques in genetic improvement and dissemination of genetic gain in livestock production and aquaculture. *Acta Agriculturae Scandinavica*. **A Animal Science**, v. 29, p. 90-97, 1998.

LI, M. *et al.* Tilapia, a good model for studying reproductive endocrinology. **General and Comparative Endocrinology**, v. 345, p. 114395, 2024.

LOZADA-SOTO, E. A. *et al.* Improving genomic selection and diversity with cryopreservation: A case study in Atlantic salmon. **Aquaculture**, p. 743275, 2025.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. A microtiter plate assay for superoxide using MTT reduction method. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 34, p. 535-539, 1997.

MAGNOTTI, C. *et al.* Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 15-25, 2018.

MARIA, A. N. *et al.* Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 191-194, 2004.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 3-4, p. 211-218, 2012.

MARWA, A. M. *et al.* Ameliorative potential of dietary supplements, ZnO-K, citrus essential oil, and pumpkin seed oil, on sperm quality in Nile tilapia: Insights from CASA, DNA integrity, antioxidant enzymes, and gene expressions. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 114, 2025.

MATAVELI, M. *et al.* Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 345-349, 2010.

MAY, S. A. *et al.* The Genomics Revolution in Nonmodel Species: Predictions vs. Reality for Salmonids. **Molecular Ecology**, v. 34, n. 23, e17758. 2025.

MERINO, O. *et al.* Effect of the temperature of activation medium on fish sperm quality: Impact on fertilization in vitro in aquaculture practice. **Reviews in Aquaculture**, v. 15, n. 2, p. 434-451, 2023.

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

MISZTAL, I.; LOURENCO, D. Potential negative effects of genomic selection. *Journal of Animal Science*, v. 102, p. 1-17, 2024.

MORRIS, G. J. *et al.* Freezing injury: the special case of the sperm cell. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 71-80, 2012.

MOTTA, N. C. *et al.* Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, v. 179, p. 14-21, 2022.

NAVARRO, R. D. *et al.* Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis spp.*) fed diet with different oil sources. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 3, p. 399-404, 2014.

NAVARRO, R. D.; BORGES CORRÊA, M. Effect of cryoprotectants on the semen quality of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Revista Ciência e Natura**, v. 46, p. 1-8, 2024.

NEUMANN, G. **Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes.** 2019. 72 f. Tese (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.

NEYRÃO, I. M. **Criopreservação em sêmen de peixes: revisão de protocolos experimentais e novas percepções.** 2022. 157f. Tese (Doutorado em Produção Animal), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2022.

- OLIVEIRA, A. V. *et al.* Extenders and Cryosolutions for Grumatã (*Prochilodus Vimbooides*) Sperm Preservation. **Cryoletters**, v. 43, n. 4, p. 246–254, 2022.
- ONUR YAMAN, S.; AYHANCI, A. **Lipid peroxidation**. London: Intech open, 2021.
- PAULA, D. A. J. *et al.* Cryopreservation of semen in streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*): use of ultra-freezer as alternative technique to liquid nitrogen. **Aquaculture International**, v. 30, n. 5, p. 2629–2639, 2022.
- PAULA, D. A. J. *et al.* Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 661–665, 2012.
- PAULINO, M. S. *et al.* Assessment of gametes in tilapia *Oreochromis niloticus*: effects of body weight in a new lineage. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, n. 2, p. 63–69, 2016.
- PEREIRA, P. N. B. *et al.* Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Higiene e sanidade Animal**, v. 10, n. 3, p. 415–435, 2016.
- PEREIRA, R. J. G.; BLANK, M. H.; ROISMANN, J. A contribuição das biotecnologias reprodutivas na conservação de espécies selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 48, p. 46–52, 2024.
- 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**, v. 74, p. 282–289, 2010.
- PETERSON, B. C. *et al.* Genetic improvement of North American Atlantic Salmon and the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* at the U. S. Department of Agriculture–Agricultural Research Service National Cold Water Marine Aquaculture Center. **North American Journal of Aquaculture**, v. 82, p. 321–330, 2020.
- PINHEIRO, J. P. S. *et al.* Use of glucose or BTS™ combined with DMSO or methylglycol under two different freezing protocols for the cryopreservation of sperm from the common curimatã (*Prochilodus brevis*). **Animal Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 779–786, 2018.
- RIBEIRO, V. S. *et al.* Tilapicultura no Brasil: uma análise regional a partir de indicadores de upgrading. **Informe Gepec**, v. 28, n. 1, p. 366–383, 2024.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. *et al.* Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família *Characidae*. **Ciência animal**, v. 22, n. 1, p. 255–268, 2012.
- 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.
- SHARAFI, M. *et al.* Cryopreservation of semen in domestic animals: A review of current challenges, applications, and prospective strategies. **Animals**, v. 12, n. 23, p. 3271, 2022.

SHI, X. *et al.* Short-term low-temperature storage and cryopreservation of qihе crucian carp (*Carassius auratus*) Sperm. **Animals**, v. 15, n. 5, p. 698, 2025.

SILVA, G. F. D. *et al.* Tilápia-do-Nilo: criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná. **Curitiba: GIA**, 2015.

SOUSA, P. C. L. **Métodos reprodutivos da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), a importância do melhoramento genético: uma revisão de literatura.** 2023. 34 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Curso de Engenharia de Aquicultura. Natal, RN, 2023.

SOUZA, U. N. *et al.* Efeito de aplicação do hormônio hCG em machos de diferentes variedades de tilápia do nilo *oreochromis niloticus*. **Boletim de Indústria Animal**, v. 75, p. 1-8, 2018.

TRIGO, P. *et al.* Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. **Andrologia**, v. 47, n. 4, p. 407-411, 2015.

TURRA, E. M. *et al.* Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p. 21–28, 2010.

VIEIRA, M. *et al.* Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de zootecnia**, v. 60, n. 232, p. 1263–1270, 2011.

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

WAN KHADIJAH, W.; ASMAD, K.; ABDULLAH, R. Cryopreservation of sperm in red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Catrina: The International Journal of Environmental Sciences**, v. 3, n. 1, p. 27–30, 2008.

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.