



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



Programa de Pós-Graduação - Mestrado
Recursos Aquáticos e Pesca

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

CAROLINE LOPES FRANÇA

**CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE DO DMSO EM RESFRIAMENTO DO
SÊMEN DO *Trachelyopterus galeatus* (SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE)**

SÃO LUÍS- MA

2020

França, Caroline Lopes.

Caracterização e toxicidade do DMSO em resfriamento do sêmen do *Trachelyopterus galeatus* (Siluriformes: Auchenipteridae) / Caroline Lopes França. – São Luís, 2020.

62 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Erivânia Gomes Teixeira.

CAROLINE LOPES FRANÇA

**CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE DO DMSO EM RESFRIAMENTO DO
SÊMEN DO *Trachelyopterus galeatus* (SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada em cumprimento as exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Erivânia Gomes Teixeira

**SÃO LUÍS- MA
2020**

CAROLINE LOPES FRANÇA

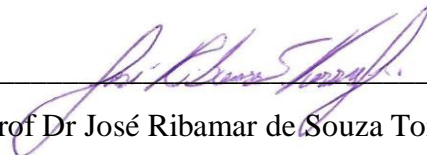
**CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE DO DMSO EM RESFRIAMENTO DO
SÊMEN DO *Trachelyopterus galeatus* (SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada em cumprimento as exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Banca examinadora




Prof Dr^a Erivânia Gomes Teixeira (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Prof Dr José Ribamar de Souza Torres Júnior
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof Dr^a Carminda Sandra Brito Salmito- Vanderley
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof Dr Ícaro Gomes Antonio
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais, Georgito Pachêco e Rosilene Lopes, que sempre me apoiaram e incentivaram durante todo esse processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai supremo por me abençoar durante esta caminhada, me enchendo de força e coragem para completar mais este ciclo profissional em minha vida.

Aos meus queridos pais, Georgito Pacheco França e Rosilene Lopes França, que sempre se esforçaram para que os estudos fossem o alicerce do meu crescimento. Obrigada por me incentivarem durante este processo, o apoio de vocês foi muito importante, o caminho até aqui não foi fácil, mas com o carinho e cuidado de vocês, ficou mais fácil. Amo vocês!!

À minha irmã, Francília Lopes França, obrigada por sempre estar comigo. Você foi especial nessa caminhada.

À minha avó Dionea Pereira de Sousa (*in memoriam*), obrigada pelo seu imenso amor para comigo, pela sua importante contribuição na minha educação, sempre me incentivando e comemorando comigo cada vitória e aprovação. Pelo orgulho que a senhora tinha ao dizer “Minha netinha faz mestrado na UEMA”.

À Jeisa Castro, você foi importante nessa jornada!! Obrigada pelos ensinamentos e pela contribuição nesta pesquisa.

À Caroline Lima da Silva, pelo auxílio durante algumas análises, seu apoio e companhia durante essa pesquisa, foram fundamentais.

À minha querida orientadora, Erivânia Gomes Teixeira. Obrigada pela valorosa contribuição no meu crescimento profissional ao longo desses anos. Foram bons momentos!!

À minha turma (PPGRAP 2018): Aleff, Ana Luiza, Ana Ribeiro, Jailza, Jackellynne, Natália Jovita, Jordana, Polyana, Sâmea e Wanda. Obrigada pelo companheirismo e amizade, vocês tornaram esses anos mais fáceis de trilhar, com a alegria de cada um de vocês. Aprendi um pouco com cada um. Jack, você foi especial nessa jornada, obrigada pela sua amizade, pelas palavras de incentivo e pelas brincadeiras, que tornaram os momentos difíceis mais leves. Obrigada por tudo!!

À toda equipe do Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos (LARAQUA), obrigada a todos, pelo auxílio nas coletas e no manejo diário na Estação de piscicultura. Em especial aos companheiros de pesquisa, João Mandú e Ricardo Santos, vocês foram importantes na contribuição deste trabalho. A vocês meu muito obrigada.

Ao Rafael, que auxiliou e forneceu os peixes que foram capturados para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Professores, José Ribamar de Souza Torres Júnior, Ícaro Gomes Antonio e Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley por suas valorosas contribuições nesta dissertação.

À Katherine Noletto, por sua disponibilidade em acompanhar e auxiliar as análises de morfologia. Obrigada pela companhia, pelas conversas e incentivo.

Às empresas: Alcon® e Guabi, pela parceria e pelo fornecimento da ração durante todo o experimento para a nutrição dos peixes utilizados nesta pesquisa.

À FAPEMA, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À UEMA e PPGRAP, pelas oportunidades e conhecimento proporcionado.

A todos que contribuíram nesta pesquisa e na conclusão deste ciclo, meu muito obrigada!!

RESUMO

O conhecimento das características seminais de uma espécie é importante para o desenvolvimento dos protocolos de preservação, promovendo aprimoramento e sucesso na reprodução artificial. A preservação do sêmen sob refrigeração é uma técnica simples e de baixo custo que promove a viabilidade espermática por horas ou dias, facilitando metodologias de reprodução artificial. O presente estudo teve como objetivo determinar as características físico-químicas do sêmen do cangati (*Trachelyopterus galeatus*) e avaliar a toxicidade do DMSO (dimetilsulfóxido) sobre o sêmen da espécie durante o resfriamento. Durante o período reprodutivo, foram coletadas amostras de 20 animais, diretamente do gonopódio em que o sêmen foi coletado com auxílio de seringas. As amostras de sêmen coletada, foram analisadas quanto à cor, volume, pH, taxa de motilidade, concentração espermática e identificação de alterações morfológicas. Para o teste de refrigeração, foi utilizado o sêmen de 5 peixes resultando em 5 amostras de sêmen, que foram diluídas em HBSS (Solução Salina Equilibrada de Hank's) adicionado de dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações (2,5%, 5,0% e 10%) na proporção de 1:4 e *in natura*. As amostras foram mantidas a 4°C por 72 horas e avaliada em intervalos de 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 hrs. O sêmen do cangati apresentou coloração branca e aspecto leitoso, sem variação de pH entre os espécimes, enquanto que o volume variou 66,6% entre as amostras. A taxa de motilidade foi de $90,6 \pm 13,4\%$ e a concentração de $2,7 \pm 0,7 \times 10^6$ células mL⁻¹. O sêmen de *T. galeatus* apresentou 14,21% de danos primários e 15,14% danos secundários. Foram identificadas alterações tanto na cabeça quanto na cauda dos espermatozoides. As maiores frequências estavam associadas às anormalidades de cauda dobrada ($12,45 \pm 0,32\%$), cauda fortemente enrolada ($4,90 \pm 0,15\%$) e defeito na cabeça ($3,5\% \pm 0,16$). Enquanto que as menores frequências foram relacionadas às alterações de cauda em formato retroaxial ($3,09 \pm 0,13\%$), cabeça sem cauda ($2,54 \pm 0,12\%$), cauda fraturada ($1,57 \pm 0,07\%$), cauda enrolada na cabeça ($1,14 \pm 0,05\%$) e espermatozoide com cauda contendo gota citoplasmática ($0,14 \pm 0,01\%$). Durante a refrigeração, foi verificada boa qualidade e viabilidade do sêmen *in natura* após 48 horas. O declínio da motilidade foi diretamente proporcional ao tempo de armazenamento. O mesmo resultado foi observado nos tratamentos com o DMSO. Foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$), entre os intervalos de tempo do sêmen diluído em HBSS para taxa de motilidade e observado que a partir do intervalo de 12 horas, os espermatozoides estavam completamente inativos. O mesmo acontecendo para HBSS + DMSO (10%). Não houve diferença significativa entre os tratamentos, sêmen *in natura*, HBSS+DMSO 2,5% e HBSS+ DMSO 5,0%, estes tratamentos indicaram maiores porcentagens após 48 horas de refrigeração ($35 \pm 8,6\%$), ($35 \pm 5\%$) e ($37,5 \pm 10\%$) respectivamente. Os tratamentos com 2,5% e 5,0 % de DMSO apresentaram porcentagem de células móveis de 20 ± 4 após 72 horas de refrigeração. A refrigeração do sêmen de cangati é uma alternativa viável, sendo possível manter por 48 horas uma apropriada qualidade e viabilidade das células espermáticas. O uso do crioprotetor DMSO nas concentrações de 2,5% e 5,0% incorporado ao diluidor HBSS favorece o prolongamento da viabilidade dos espermatozoides com porcentagem de células móveis de $35 \pm 5,0\%$ e $37,5 \pm 10,3\%$ respectivamente após 48 horas de refrigeração.

Palavras –chaves: Conservação de gametas. Parâmetros Espermáticos. *Trachelyopterus galeatus*. Cangati. Espermatozoide

ABSTRACT

Knowledge of the seminal particulars of a species is important for the development of preservation protocols, promoting improvement and success in artificial reproduction. Conservation of semen in refrigeration is a simple and low-cost technique which promotes sperm viability for hours or days, facilitating artificial reproduction methods. The present study aimed to determine the particulars physicochemical semen of cangati (*Trachelyopterus galeatus*) and assess the toxicity of DMSO (dimethylsulfoxide) on the semen of the species during cooling. During the reproductive period the reproductive, samples were collected from period 20 animals, directly in the gonopodium in which the semen was collected using syringes. The semen samples collected were analyzed for, color, volume, pH, motility rate, sperm concentration and identification of morphological changes. For the refrigeration test, 5 fish semen was used resulting in 5 semen samples, that have been diluted in HBSS (Hank's Balanced Saline Solution) added from dimethylsulphoxide (DMSO) in different concentrations (2.5%, 5.0% e 10%) in proportion to 1:4 and *in natura*. The samples were kept at 4 ° C for 72 hours and evaluated at intervals of 0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours. Semen from presented white color and milky appearance, without variation of pH between specimens, while the volume varied 66.6% between samples. The motility rate of $90.6 \pm 13.4\%$ and the concentration of $2.7 \pm 0,7 \times 10^6$ cells mL⁻¹. Semen from *T. galeatus* to presente 14. 21% of abnormalities primary and 15.14% primary and secondary. Changes in the head and tail of the sperm have been identified. The highest frequencies were associated with abnormalities of the bent tail (12. 45 \pm 0. 32%), tightly curled tail (4. 90 \pm 0. 15%) and head defect (3. 5% \pm 0.16). While the lowest frequencies were related to tail changes in shape retroaxial (3. 09 \pm 0. 13%), head without tail (2. 54 \pm 0. 12%), fractured tail (1. 57 \pm 0. 07%), tail curled on the head (1.14 \pm 0,05%), and sperm with tail containing cytoplasmic drop (0.14 \pm 0.01%). During cooling, has been verified good semen quality and viability *in natura* after 48 hours. The decline in motility was directly proportional to the storage time, the same result was observed in treatments with DMSO. Significant difference was found ($p < 0.05$), between the time intervals of the semen diluted in HBSS for motility rate and observed that from the interval of 12 hours, sperm were completely inactive. The same happening for HBSS + DMSO (10%). There was no significant difference between treatments semen *in natura*, HBSS+DMSO 2.5% e HBSS+ DMSO 5. 0%, these treatments indicated the highest percentage after 48 hours of refrigeration (35 \pm 8.6 %), (35 \pm 5%) e (37. 5 \pm 10%) respectively. Treatments with 2.5 % and 5.0% of DMSO showed a percentage of mobile cells of 20 \pm 4 after 72 hours of refrigeration. The refrigeration of semen from cangati is a viable alternative, being possible to maintain for 48 hours appropriate quality and viability of sperm cells. The use of the cryoprotectant DMSO in concentrations of 2.5% and 5.0% incorporated to diluente HBSS support the prolongation of sperm viability with a percentage of mobile cells in 35 \pm 5.0 % e 37,5 \pm 10,3% after 48 hours of refrigeration.

Keywords: gamete conservation. Parameters Spermatic. *Trachelyopterus galeatus*. Cangati. Spermatozoa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de *T. galeatus* capturado em Arari - MA 16
- Figura 2.** Órgão copulador (gonopódio) de *T. galeatus* 17
- Figura 3.** Micrografia eletrônica de varredura representativa de espermatozoides de peixes que realizam fertilização externa (esquerda, Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e fertilização interna (rabo de espada verde, *Xiphophorus helleri*) 24
- Figura 4.** Detalhes de uma câmara de Neubauer (esquerda). Esquema de contagem dos espermatozoides nos cantos e no centro da câmara de Neubauer (direita) 30
- Figura 5.** Micrografia de contraste de fase, apresentando morfologia e indicando as principais anomalias nos espermatozoides de *Trachelyopterus galeatus* (100 X). (A) normal, (B) cauda dobrada, (C) espermatozoide com cauda fortemente dobrada, (D) defeito na cabeça (irregularidade da membrana), (E) espermatozoide sem cauda (F) cauda enrolada na cabeça 34
- Figura 6.** Micrografia de contraste de fase indicando espermatozoide de *T. galeatus* com apêndice distal a cabeça (seta) 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação da concentração espermática em teleósteos	21
Tabela 2. Descrição das anomalias analisadas em espermatozoides de cangati <i>T. galeatus</i> (adaptada de Miliorini et al. 2011)	31
Tabela 3. Parâmetros espermáticos de <i>Trachelyopterus galeatus</i> (n=20) cultivado no Maranhão- Brasil	33
Tabela 4. Principais danos identificados no sêmen <i>in natura</i> de <i>Trachelyopterus galeatus</i> cultivado no nordeste do Brasil	30
Tabela 5. Porcentagem de motilidade (%; média e erro padrão) dos espermatozoides de cangati (<i>Trachelyopterus galeatus</i> ; n=5) estocados durante 72 horas a 4° C <i>in natura</i> , diluído com HBSS e diluído com HBSS + DMSO em diferentes concentrações (2,5%, 5,0% e 10%) n=5	35

LISTA DE SIGLAS

pH	potencial hidrogeniônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
MA	Maranhão
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
HBSS	Solução Salina Equilibrada de Hank's
ANOVA	Análise de variância
ROS	Células oxidativas de oxigênio
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	Universidade Estadual do Maranhão
UECE	Universidade Estadual do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 <i>Objetivo geral:</i>	14
2.2 <i>Objetivos específicos:</i>	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 Pesca e a Aquicultura	15
3.2 <i>Espécie em estudo</i>	16
3.3 Caracterização espermática	18
3.3.1 <i>Motilidade espermática</i>	18
3.3.2 <i>Concentração espermática</i>	22
3.3.4 <i>Morfologia espermática</i>	23
3.4 <i>Diluidores e Crioprotetores</i>	25
3.5 <i>Toxicidade</i>	26
3.6 <i>Refrigeração</i>	27
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	28
<i>Seleção dos Animais e área de coleta</i>	28
<i>Coleta do material</i>	29
<i>Caracterização do sêmen</i>	29
4.4 Refrigeração teste de toxicidade em resfriamento ou em refrigeração	31
4.5 <i>Análise estatística</i>	32
5.0 RESULTADOS	32
5.1 <i>Caracterização do sêmen</i>	32
5.2 <i>Refrigeração</i>	34
6.0 DISCUSSÃO	35
7.0 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

A intensa procura por proteína de origem animal e de boa qualidade tem favorecido o desenvolvimento da produção aquícola. Atividades como a pesca e a aquicultura serão fundamentais para atender a demanda mundial por pescado, quando proporcionarão um aumento de 104% na produção no ano de 2025 (FAO, 2016). Este crescimento está relacionado aos investimentos realizados neste setor nos últimos anos, inclusive em tecnologias para o desenvolvimento da produção com sustentabilidade.

Porém, devido ao avanço populacional e industrial, ações antrópicas têm contribuído para a degradação do ambiente aquático, afetando diretamente os recursos pesqueiros e os estoques naturais (MORAES; JORDÃO, 2002). O excesso do extrativismo dos estoques pesqueiros e a possível estagnação deste recurso têm favorecido os investimentos na atividade piscícola (FAO, 2011). Tal cenário é realidade mundial, inclusive no Brasil, onde os recursos aquáticos vêm sofrendo as mais diversas agressões.

O Brasil apresenta grande potencialidade para o desenvolvimento da aquicultura, em função da sua ampla rede hidrográfica, diversidade de espécies com importância comercial, grandes corpos d'água artificiais (reservatórios), clima favorável, além de uma diversidade de subprodutos agrícolas que podem ser usados na alimentação de peixes (ARANA, 2004).

A região Nordeste do Brasil, em 2015, foi responsável por 17,4% da produção nacional de peixes com destaque para os estados do Ceará e do Maranhão (VIDAL, 2016). Este último vem apresentando potencialidade para o desenvolvimento desta atividade, com condições climáticas e hidrográficas favoráveis além da diversidade de espécies nativas com elevado interesse e valor comercial (SILVA, 2016).

Ainda que as características geográficas do país favoreçam o desempenho da atividade piscícola, ampliar as pesquisas para essa atividade é um método eficaz para que exista o controle da exploração do estoque natural pesqueiro (AMBRULHOSA, 2011) e incremento da produção.

Em pisciculturas, a produção de alevinos depende principalmente da manutenção de plantéis de reprodutores, com o objetivo de gerar descendentes, favorecendo a frequente renovação e evitando problemáticas como endocruzamentos, que é o acasalamento entre indivíduos de parentesco próximo (CARNEIRO, 2007). Sendo assim, a origem do plantel de reprodutores exige cuidados (BOCK e PADOVANI, 2000).

No entanto, a grande dificuldade na seleção de reprodutores do ambiente natural e os altos custos de manejo destes animais em pisciculturas têm influenciado o processo da reprodução artificial (JORSTAD e NAEVDAL, 1996). De acordo com o mesmo autor, a montagem de um banco de sêmen é uma alternativa segura para manter o tamanho satisfatório da população auxiliando assim na manutenção do plantel, descartando o uso de um grande número de reprodutores, além da redução com gastos de hormônio e melhor atenção às fêmeas no período da desova.

Neste sentido, promover estudos sobre a caracterização seminal é relevante na rotina da propagação artificial, onde as técnicas de conservação de sêmen são alternativas positivas que visam facilitar o manejo e aumentar a eficácia da reprodução (OLIVEIRA et al., 2007).

Técnicas de conservação do sêmen, como a refrigeração e o congelamento em nitrogênio líquido, vêm sendo desenvolvidas com sucesso em várias espécies cultivadas em todo o mundo, destacando estudos com a truta, *Oncorhynchus mykiss* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006); a carpa comum, *Cyprinus carpio* (HORVÁTH et al., 2003); o “striped bass” *Morone saxatilis* (SHUYANG HE; WOODS III, 2004); o bagre europeu, *Silurus glanis* (LINHART et al., 2005); a tilápia, *Oreochromis niloticus* (TEIXEIRA, 2013); a curimatã, *Prochilodus brevis* (LOPES et al., 2014); e o tambaqui, *Colossoma macropomum* (PINHEIRO et al., 2016). Porém, ainda são incipientes os estudos relacionados ao uso destas técnicas em espécies nativas como o cangati (*Trachelyopterus galeatus*).

A refrigeração consiste na preservação do sêmen a curto prazo e em baixas temperaturas, mantendo sua viabilidade espermática por horas ou dias, sem atingir o congelamento, dispensando o uso de substâncias crioprotetoras (MARQUES; GODINHO, 2004) proporcionando assim, facilidade no manejo, excluindo a presença do macho no momento da fecundação e favorecendo atenção às fêmeas, sendo uma técnica simples e de baixo custo (CARNEIRO et al., 2006). Os mesmos autores ainda afirmaram que a conservação do sêmen de peixes favorece o aperfeiçoamento de técnicas na propagação artificial, promovendo a troca de material genético entre fazendas aquícolas, evitando o transporte de animais e adotando o uso racional dos reprodutores. Também permite o transporte do material genético para longas distâncias, com baixo custo, segurança, além de preservar a saúde do animal (CARNEIRO et al., 2012).

O sucesso da refrigeração está diretamente relacionado com a qualidade espermática e eficiência dos diluentes. As características espermáticas variam muito entre as espécies de peixes e são de grande importância para desenvolvimento do perfil espermático da espécie. Assim é relevante identificar as características físico-químicas, volume, turbilhonamento, coloração, textura e concentração, pH, osmolaridade, além das características morfológicas dos espermatozoides (FONSECA, 1992).

O conhecimento desses parâmetros é importante para o desenvolvimento de técnicas e protocolo de conservação das células espermáticas, aprimoramento e sucesso da reprodução artificial (CARNEIRO, 2007). Estudos relacionadas à caracterização, viabilidade e conservação espermática, contribuirão para a implantação de protocolos de conservação, além de contribuírem como ferramentas para diminuir o desequilíbrio ecológico e aumentar os benefícios econômicos desenvolvendo técnicas de melhoramento genético e reprodutivo (TANAKA et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, desenvolver um protocolo de preservação a curto prazo para o sêmen do cangati (*T. galeatus*) e verificar a toxicidade do crioprotetor DMSO através do processo de refrigeração incorporando-o ao diluente.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral:*

- Caracterizar o sêmen e verificar a toxicidade do crioprotetor DMSO em diferentes concentrações na refrigeração do sêmen do cangati *Trachelyopterus galeatus*.

2.2 *Objetivos específicos:*

- Determinar as características físico-químicas e morfológicas do sêmen do cangati;
- Testar diferentes concentrações do crioprotetor Dimetilsulfóxido incorporado ao diluente na refrigeração do sêmen de cangati (*Trachelyopterus galeatus*)

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A Pesca e a Aquicultura

A intensa procura por alimentos de qualidade associados à qualidade de vida, tornou-se uma tendência mundial, favorecendo o desenvolvimento da indústria aquícola através do consumo de pescado (FAO, 2002). Segundo o mesmo autor, os dados apontam que a exploração do pescado em ambiente natural, manteve-se constante nos últimos anos, indicando os mesmos índices encontrados no início da década de 90, apresentando uma estagnação, com tendência de diminuição futura.

O desenvolvimento da indústria aquícola no Brasil vem apresentando destaque, sendo considerada uma alternativa promissora de investimento à produção do pescado (ROCHA et al., 2013). Paralelamente, a pesca extrativista continental vem apresentando tendências de estagnação enquanto que a aquicultura tem assegurado um crescimento produtivo e substancial, assim, a intensa exploração dos estoques naturais de peixes têm implicado em estudos ambientais favorecendo assim a implantação de sistemas aquícolas (NAYLOR et al., 2000).

A pesca extrativista e sua constante busca pela abundância do pescado capturado, adicionado a atividade antrópica degradante nas regiões costeiras e estuarinas, tem contribuído para o desequilíbrio dos estoques pesqueiros (PALHETA; Da SILVA, 2011).

Sendo assim, em virtude da demanda mundial de pescado se faz necessário à busca por alternativas que venham a suprir tal lacuna e o cultivo de peixes é uma alternativa, atuando na complementação natural de pescado, buscando também a sustentabilidade econômica e ambiental (ANDRADE; YASUI, 2003). De acordo com os mesmos autores é importante desenvolver tecnologias para o cultivo de peixes em águas interiores e no mar, portanto, diversas espécies de água doce e salgada, são cultivadas em variados sistemas de produção.

Vale salientar a importância pela busca de novas espécies de peixes que apresentem potencial para o cultivo, que ofereçam bom desempenho zootécnico e que tenham boa aceitação no mercado, não esquecendo da necessidade de possibilitar sua exploração também através da pesca de forma segura no tocante a segurança dos estoques naturais (SIDONIO et al., 2012). Várias espécies nativas apresentam tais requisitos e dentre elas, se apresenta o cangati (*T. galeatus*).

3.2 *Espécie em estudo*

A espécie *T. galeatus* (Fig. 1), é amplamente distribuída em toda a América do Sul, conhecido vulgarmente como Cangati, essa espécie pertence à família dos Auchenipteridae da ordem dos Siluriformes, característicos de regiões alagadas, com vegetação aquática flutuante, hábitos tipicamente noturnos, de águas lânticas (BORGES et al., 1999; SOARES et al., 2006) e adapta-se facilmente em regiões com hipóxia. Sua classificação segue (ITIS, 2018):

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Superclasse: Actinopterygii

Classe: Teleostei

Superordem: Ostrariophysii

Ordem: Siluriformes

Família: Auchenipteridae

Gênero: *Trachelyopterus*

Espécie: *Trachelyopterus galeatus*

Figura 1. Exemplar de *Trachelyopterus galeatus* capturado em Arari - MA.



Fonte: o autor (2020)

O cangati possui hábito alimentar onívoro e dieta composta por peixes pequenos, vermes, insetos, artrópodes e frutas (CLARO-JR et al., 2004; SANTOS, 2005). É um peixe de pequeno a médio porte e quanto à anatomia este animal apresenta uma cabeça ossificada, boca terminal e olhos laterais; barbilhões geralmente curtos, sendo um par maxilar e dois

mentonianos; nadadeira dorsal localizada na porção anterior do corpo, assim como a peitoral provida de espinhos (Le BAIL et al., 2000). Com dimorfismo sexual, os machos apresentam uma adaptação no primeiro raio da nadadeira anal, modificada em Gonopódio (Figura 2), órgão copulador (FERRARIS, 2003; MEISNER, 2000), os testículos são em forma de franja, com presença de vesícula seminal na porção caudal (PARREIRA et al., 2009). Essa característica sexual é observada em indivíduos machos das famílias Auchenipteridae e Callichthyidae, favorecendo a fecundação interna (MAZZOLDI et al., 2007). Outra característica sexual evidente na família Auchenipteridae é uma modificação do barbilhão maxilar no período de reprodução (PINNA, 1998).

Figura 2. Órgão copulador (gonopódio) de *Trachelyopterus galeatus*.



Fonte: Riedel (2020)

Ainda sobre os aspectos reprodutivos, algumas espécies desta família apresentam características reprodutivas diferenciada, com modificações morfofuncionais ao espermatozoide e ao aparelho reprodutor, tanto masculino quanto feminino (BURNS et al., 2002; SPADELLA; OLIVEIRA; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2008; PARREIRA et al., 2009).

Espermatozoides com cabeça alongada foram relatados para *T. galeatus*, essa morfologia está associada ao modo reprodutivo da espécie, o alongamento da cabeça dos espermatozoides ocorre para facilitar a passagem destes pelo gonopódio lobular e pelas estruturas labirínticas das fêmeas após inseminação (BURNS et al., 2002; JAMIESON, 2009). Loir et al. (1989) e Meisner et al. (2000), identificaram espermatozoides no lúmen ovariano desta espécie, outros autores ainda relataram a presença de uma secreção mucosa que acompanhava os espermatozoides, que conecta à papila genital da fêmea no momento da cópula (CHACON e MENDES FILHO, 1972).

A espécie *T. galeatus* apresenta característica reprodutiva de vivíparos. Dourado (1981), em estudos sobre as espécies abundantes em açudes controlados pelo DNOCS, identificou

algumas características reprodutivas da espécie, como a reprodução periódica e fecundação interna, apresentando tamanho de 1ª maturação de 16 cm. O Cangati é considerado sedentário, com cuidado parental, formação de ninhos, ovos adesivos e baixa fecundidade (BRAGA, 2001). A incipiência de estudos sobre a sua importância comercial, dificuldades relacionadas ao manejo em cultivo, a reprodução da espécie, além das características reprodutivas como a caracterização espermática, torna o presente estudo relevante, na busca de novas tecnologias para o cultivo da espécie.

3. 3 Caracterização espermática

Estudos relacionados ao conhecimento da biologia do sêmen de peixes e suas características para favorecer o sucesso reprodutivo, tiveram início no século XIX, quando identificaram entre outras problemáticas, a necessidade de se determinar a proporção sêmen: ovócitos no manejo reprodutivo (BILLARD E COSSON, 1992). Assim, estes mesmos autores identificaram algumas características como: foram identificadas, como: imobilidade do espermatozoide, curta duração do seu movimento pós-ativação e a necessidade de diluição em água para início do movimento.

A determinação das características espermáticas de uma espécie é de grande importância, pois contribui na rotina da propagação artificial, favorece a seleção de animais e promove o uso racional dos gametas (BOMBARDELLI et al. 2006 a).

Entre as características mais importantes da caracterização espermática está a motilidade, no entanto, não deve ser tomada unicamente como o fator de qualidade seminal, pois outras características são relevantes para elucidar a caracterização da qualidade seminal de uma espécie, como; volume, vigor, concentração e as características morfológicas do espermatozoide (ROUTRAY et al., 2007).

A qualidade seminal pode variar entre indivíduos de uma mesma espécie e fatores como a idade dos reprodutores a fase do ciclo reprodutivo, sucessivas coletas de sêmen e indução hormonal (PAULINO et al., 2011), podem influenciar o potencial de fertilização dos animais.

Diante disso, o conhecimento dos parâmetros seminais, auxilia na determinação da qualidade do sêmen coletado, promovendo sua utilização racional na reprodução artificial.

3. 3. 1 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática, está relacionada a taxa de espermatozoides móveis, sendo importante parâmetro na análise da qualidade seminal e na verificação da

capacidade de fertilização (RURANGWA et al., 2004; MAGGESE et al., 1984; KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA, 1986; FOGLI DA SILVEIRA et al., 1990; FAUVEL et al., 1999).

A determinação da taxa de motilidade espermática é frequentemente usual em metodologias de desova induzida, no desenvolvimento de protocolos para criopreservação espermática, além de impedir a competição espermática (HOLT et al., 2002).

Outro parâmetro bastante utilizado para avaliar a qualidade seminal, é o tempo de motilidade, que é o período em que os espermatozoides permanecem ativos até a parada total de sua atividade (BILLARD, 1986; INGERMANN et al., 2002).

A motilidade espermática é um processo associado diretamente a fertilização e aos aspectos específicos da biologia do espermatozoide (YOSHIDA et al., 2008). Estes, são importantes na compreensão da evolução dos processos de fertilização (YOSHIDA et al., 2008). Alterações do meio extracelular, desencadeiam como fonte de sinais para a ativação ou alterações da motilidade espermática, estes aspectos indicam relação com o modo reprodutivo das espécies e o processo de fertilização (DZYUBA; COSSON, 2014).

Para os animais de fertilização interna, a ativação e alterações da motilidade ocorrem dentro do trato reprodutivo feminino e masculino, enquanto que para animais com dinâmica reprodutiva em ambiente externo, a ativação espermática só ocorre quando há contato com o meio aquoso (GERVASI; VISCONTI, 2017).

Em teleósteos que fertilizam internamente, o gameta masculino é transferido às fêmeas por meio dos órgãos copulatórios, que geralmente são barbatanas pélvicas ou anais, modificadas, como clasperes em Chondrichthyes (WORMS, 1977), gonopodia em poeciliídeos ou andropodia (barbatana dividida) em goodeídeos (MEYER; LYDEARD, 1993).

A transferência de espermatozoides ocorre associado a feixes denominados “espermatóforos”, que assim como espermatozeugmata, são adaptações que auxiliam na transferência de gametas masculinos para as fêmeas e pode ser uma estratégia, para evitar a perda do material fecundante (GREVEN, 2005; GRIER, 1978). Estas adaptações já foram relatadas para auchenipterídeos como: *Tadia brunnea* (LOIR et al., 1989), *Trachelyopterus lucenai* (MEISNER et al., 2000; BURNS et al., 2002), e *Auchenipterus nuchalis* (MAZZOLDI et al., 2007). Além de ser bem relatada para o peixe inseminante do presente estudo, *T. galeatus* (PARREIRA et al., 2009; MELO et al., 2011).

Durante a liberação dos espermatozoides no trato reprodutivo das fêmeas, um ambiente que geralmente é isotônico para o corpo e para o meio intracelular dos espermatozoides, ocorre a ativação espermática. Diante disso, o ambiente aquoso pode comprometer a transferência dos

gametas (LIU et al., 2018). Portanto, tais aspectos indicam que o meio isotônico do lumén ovariano pode ser capaz de ativar a motilidade dos espermatozoides durante um longo período (TIERSCH et al., 2011; YUE et al., 2018).

Como ocorre por exemplo, em espécies do gênero *Xiphophorus*, *Macrozoarces* e espécies da família Poeciilidae, que apresentam dinâmica diferenciada quanto a ativação espermática, em que uma vez iniciada a motilidade, os espermatozoides dessas espécies podem permanecer móveis continuamente por uma semana (HUANG, et al; 2004), para os espermatozoides do tubarão – leopardo (*Triakisscyllium*), a atividade espermática, ocorre ainda no trato reprodutivo dos machos e permanece móvel no trato reprodutivo da fêmea (soluções eletrolíticas isotônicas) por mais de 12 horas (INABA et al., 1998).

A atividade espermática inicial das células está diretamente associada a quantidade de ATP intracelular e o fim pode estar associado a diminuição deste ATP (BILLARD et al., 1993), mesmo que não seja totalmente reduzido (BILLARD & COSSON, 1992). Tal diminuição ocorre pela redução do estoque de energia, porém diversos elementos podem influenciar a duração da motilidade dos espermatozoides, bem como sua capacidade reprodutiva, a exemplo das soluções ativadoras e sua osmolaridade (ALAVI et al., 2009), além da temperatura, estado nutricional e sanitário dos animais, condições de análise e espécie estudada (MURGAS et al., 2011).

Por outro lado, espermatozoide de espécies de peixes que fertilizam externamente apresentam outra dinâmica de ativação espermática, em que a maioria das espécies apresentam seus espermatozoides imóveis nas gônadas e adquirem motilidade no momento que entram em contato com o meio aquoso, ou outro meio suficientemente hiposmótico (MURGAS et al., 2004).

Tais características foram reafirmadas por Islam e Akhter (2012), que ressaltaram que meios hiposmóticos ou hiperosmóticos favorecem o início da motilidade espermática. Para Stoss (1983), a hipotonicidade é um dos elementos que pode justificar a indução da motilidade em peixes de água doce, onde o início da motilidade espermática ocorre principalmente quando a osmolaridade diminui (TAKAI e MORISAWA, 1995).

Após a ativação, os espermatozoides de teleósteos de fecundação externa permanecem móveis durante um curto período de tempo, sendo inferior a um minuto (MELO E GODINHO, 2006), outros autores indicam tempo médio de dois minutos (KIME et al., 2001; RURANGWA et al., 2004). Assim, a duração da motilidade espermática em espécies de peixes de água doce

com essa dinâmica reprodutiva é muito curta e variável (LEGENDRE et al., 1996; COSSON et al., 1999).

Para Morisawa et al. (1999), o pH ou íons presentes, podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática, já Kowalski e Cejko (2019), afirmaram que outros elementos como os componentes do plasma seminal (íons, lipídios e proteínas), além da atividade enzimática e proteolítica também influenciam a maturação dos espermatozoides.

Em estudo desenvolvido por Morisawa e Suzuki (1980), com espécies de peixes de água doce (*C. carpio*, *Carassius carassius* e *Tribolodon hakonensis*), mostraram que os espermatozoides foram móveis quando diluídos em soluções hipotônicas, ou seja, soluções que apresentaram menor quantidade de sais e menor osmolaridade.

A osmolaridade ou pressão osmótica é o principal fator controlador responsável pela motilidade de espermatozoides de vários grupos de peixes, como os ciprinídeos (ALAVI; COSSON, 2006; COSSON, 2004); Characiformes como *C. macropomum* (CARNEIRO et al., 2012); *Brycon insignis* (PADUA et al., 2012), *Brycon orbigniaus* e *Prochilodus lineatus* (GONÇALVES, 2013).

A influência da osmolaridade na motilidade espermática já foi verificada para algumas espécies de peixes. Para os Characiformes, foi possível verificar que soluções de glicose ou NaCl com osmolaridade superior (325 a 365 mOsm kg) a do líquido seminal (318 mOsm kg⁻¹), não ativaram o sêmen de *Brycon opalinus* e abaixo de 285 mOsm kg⁻¹ permitiram a ativação das células espermáticas (ORFÃO et al., 2011). Já, Melo e Godinho, (2006) observaram que concentrações de NaCl menores que 75mM (~150mOsm kg⁻¹), forneceram taxa de motilidade variando entre 75 e 90% de células para o sêmen de *Brycon orthoatenia*.

Neste sentido, para diferentes espécies a variação na pressão osmótica 100, 180, 200, 125, 270 e 274 mOsm kg⁻¹, são eficazes para ativação de espermatozoides de *B. opalinus* (ORFÃO et al., 2011); *B. orbignyanus* (GONÇALVES, 2013); *C. Carpio* (ALAVI; COSSON, 2006); *P. lineatus* (GONÇALVES, 2013); VIVEIROS et al., 2016); *C. macropomum* (CARNEIRO et al., 2012) e *B. insignis* (SHIMODA et al., 2007), respectivamente.

Assim, em estudos de qualidade seminal é importante desenvolver soluções que irão desencadear boa ativação espermática, sem que ocorra a exposição das células a condições osmóticas extremas, favorecendo assim, um prolongamento da motilidade e da fertilidade (LAHNSTEINER & PATZNER, 1998; COSSON et al., 1999).

3.3.2 Concentração espermática

A concentração espermática é uma variável quantitativa comumente utilizada na rotina de estudos relacionados a qualidade espermática, em animais de fecundação interna e externa. Tal análise é importante para verificar o potencial do material fecundante, contribuindo para elevada taxas de fertilização (FELIZARDO et al., 2010).

Essa concentração é determinada através da quantidade de espermatozoides por mililitro de sêmen, mensuradas através do uso de técnicas como espermátocrito e contagem microscópica. Essa contagem pode variar de acordo com a espécie, a idade e fatores sazonais do ambiente, uma vez que, algumas espécies de peixes têm seu período reprodutivo associado ao período de chuva (SOLIS-MURGAS et al., 2011; SHIMODA et al., 2007; GODINHO, 2000). A densidade espermática de peixes está diretamente relacionada ao estágio maturacional, essa produção geralmente é elevada em função das divisões espermatogoniais (MARQUES, 2001). Em algumas espécies o macho chega a produzir 100 bilhões de espermatozoides/ano/kg do peso do corpo ou mais de 1×10^9 espermatozoides/g de testículos/dia, obtendo uma produção superior a relatada para mamíferos (BILLARD, 1990).

O número de espermatozoides é altamente variável entre as espécies de peixes nativos (Tabela 1), o aumento da concentração espermática é observado quando os peixes são submetidos a indução hormonal, quando comparado aqueles que não são (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

Tabela 1. Variação da concentração espermática em teleósteos

Espécie	Concentração (cel/mL⁻¹)	Autor
<i>Lutjanus synagris</i>	$2,2 \pm 0,2 \times 10^9$	SANCHES et al. (2010)
<i>Mugil liza</i>	$2,5 \pm 1,5 \times 10^9$	MAGNOTTI et al.(2018)
<i>O. niloticus</i>	$2,63 \times 10^9$	MATAVELI et al. (2007)
<i>Brycon amazonicus</i>	4,8 a $14,2 \times 10^9$	CRUZ CASALLAS et al. (2006)
<i>B. orbignyanus</i>	$8,21 \pm 2,26 \times 10^9$	MURGAS et al. (2004)
<i>C. macropomum</i>	12 a 27×10^9	PINHEIRO et al., (2016)
<i>Steindachneridion scripta</i>	19,5 a $120,1 \times 10^9$	LUZ et al. (2001)
<i>P. lineatus</i>	$20 \pm 3,0 \times 10^9$	ORFÃO et al. (2010)
<i>Brycon nattereri</i>	$30 \pm 5,6 \times 10^9$	OLIVEIRA et al. (2007a)

Fonte: o autor (2020)

O tipo de hormônio utilizado na indução hormonal, influencia na concentração, a aplicação do hormônio altera o plasma seminal, diluindo o sêmen e aumentando o volume seminal (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

Conhecer a concentração espermática, bem como o volume e a taxa de espermatozoides móveis é de grande importância para a diluição do material fecundante além de mensurar a capacidade de produção espermática de cada animal e a razão entre machos e fêmeas no manejo reprodutivo (SALISBURY e VANDEMARK, 1964).

3.3.4 Morfologia espermática

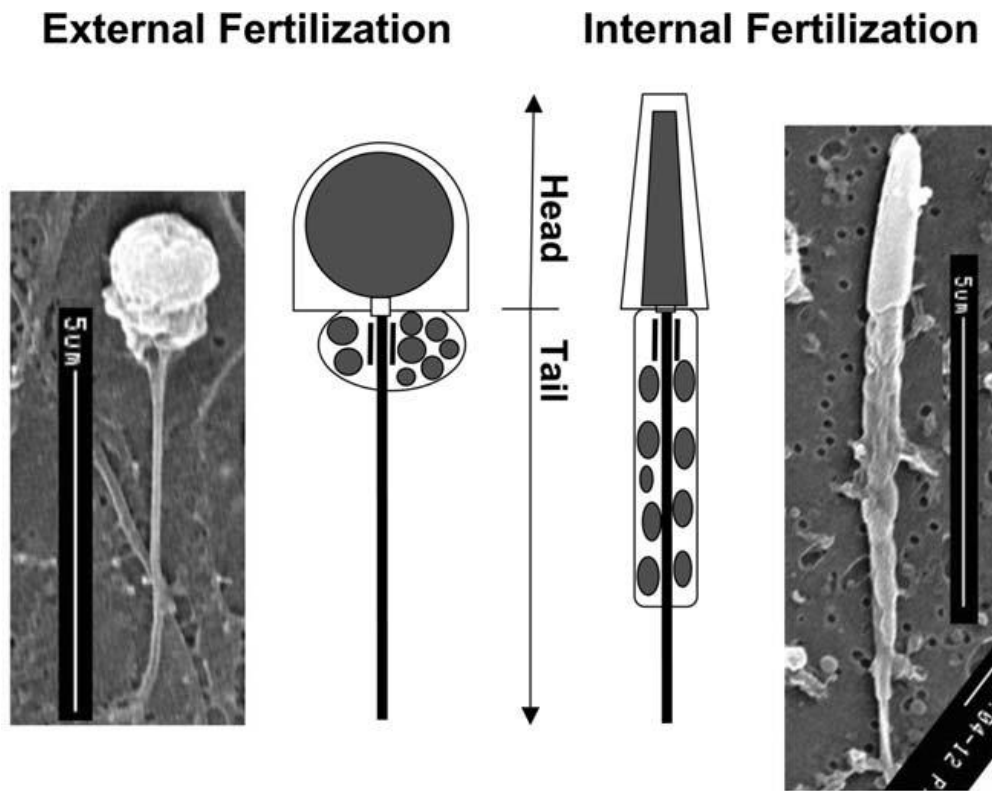
A avaliação da morfologia espermática é uma análise relevante para verificar a qualidade do sêmen, por meio dela é possível verificar a presença de anormalidades espermáticas, que irão inferir na capacidade de fertilização dos espermatozoides (LAHNSTEINER et al., 1998). Estas anormalidades ocorrem naturalmente, e podem ser identificadas no sêmen *in natura* das espécies (STREIT JR. et al., 2004).

Em relação a estrutura morfológica, os espermatozoides de peixes são amplamente diferentes, tanto em forma como em estrutura (MATTEI, 1991). Também podem variar em tamanho, sendo alguns aflagelados, outros biflagelados, além do número e organização das organelas (BACCETTI, 1986; BACCETTI et al., 1984; JONES; BUTLER, 1988).

Geralmente, são compostos estruturalmente por cabeça, peça intermediária e cauda, não apresentando acrossoma. A falta dessa estrutura é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion dos ovócitos que facilita a penetração do espermatozoide, para início da fertilização (COSSON et al., 1999).

Grier et al. (1978), afirmaram que essas diferenças apresentam relação com o modo reprodutivo e a posição sistemática (Fig. 3). Estes autores ainda relatam que as espécies de teleosteos de fertilização externa preservaram as características do espermatozoide ancestral e apresentam o núcleo arredondado, enquanto que os espermatozoides de espécies de fertilização interna (espécie do presente estudo), apresentaram modificações evolutivas e possuem um núcleo alongado e peça intermediária e mitocôndrias bem desenvolvidas, bainhas na peça intermédia do espermatozoide, além de intensa atividade glicolítica (STOSS, 1983a), semelhante aos espermatozoides de mamíferos (KALLMAN, 1975).

Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura representativa de espermatozoides de peixes que realizam fertilização externa (esquerda, Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e fertilização interna (direita, rabo de espada verde, *Xiphophorus helleri*).



Fonte: C. Huang et al. (2004)

Na fertilização interna em peixes, durante o processo reprodutivo, o macho transfere espermatozoides em embalagens (espermatóforos), estes são armazenados em um receptáculo no trato genital das fêmeas por vários meses após a inseminação (KALLMAN, 1975; PAABEN et al., 1996).

As diversas diferenças e adaptações morfológicas das células espermáticas em espécies de dinâmica reprodutiva interna estão diretamente associadas a sobrevivência a longo prazo destas células no trato reprodutivo feminino, apresentando condições fisiológicas diferenciadas, quando associados ao espermatozoide que fertiliza externamente (TIERSCH, 2001). É importante ressaltar que essas diferenças morfológicas, apontam complexidades desconhecidas e possibilidades para metodologias de preservação espermática (HUANG et al., 2004a).

Dessa forma, a avaliação da morfologia espermática é relevante para otimizar o processo da reprodução artificial, bem como prevenir problemáticas de poliespermia, além de favorecer o desenvolvimento de técnicas de criopreservação (GINZBURG, 1968).

3.4 Diluidores e Crioprotetores

Os diluidores são soluções a base de sais e carboidratos (açúcares), que contribuem para manter as células com viabilidade durante a refrigeração (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012). A solução diluidora é composta por um diluente, que tem a função de diluir e fornecer nutrientes as células. Para que os diluidores atuem com eficiência, algumas condições são exigidas, como a isotonicidade do diluidor, para que não haja ativação dos espermatozoides; que ele seja estável, onde as características físico-químicas não sejam alteradas durante o contato com as células espermáticas; estéril, para que não conduza microorganismos que venham trazer danos as células; e que apresente condutividade térmica elevada, que transfira rapidamente a temperatura do meio externo para os espermatozoides (MARIA, 2005; LEGENDRE; BILLARD, 1980; CARNEIRO, 2007). Dentre os diluidores, os mais comumente utilizados são: cloreto de sódio; glicose; sacarose; Ringer para peixes, água de coco, água de coco em pó (ACP), BTS (Beltsville Thawing Solution®), HBSS(Solução Salina equilibrada de Hank) (CARVALHO et al., 2014; HUANG et al., 2004; MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003; VIVEIROS et al., 2010; VUTHIPHANDCHAI; CHOMPHUTHAWACH; NIMRAT, 2009; LEITE et al., 2011), vem sendo utilizados, com eficiência para a nutrição das células no processo de preservação a curto prazo.

Os crioprotetores, por sua vez, são soluções que irão atuar em associação com os diluidores. Podendo ser intra e extracelulares, e possuem a função de proteger os espermatozoides contra o choque térmico (CARNEIRO et al., 2012). Os crioprotetores intracelulares atuarão na redução do ponto crioscópio intracelular, evitando a formação de cristais de gelo, impedindo que haja um elevado estresse osmótico para os espermatozoides através da adição de água para manter o volume seminal, reduzindo o ponto de congelamento da água e agindo como regulador tampão ajustando as alterações de pH (SOARES; PESSOA, 2009; MEDEIROS et al., 2002).

Os principais crioprotetores usados no protocolo de criopreservação para células espermáticas são, DMSO; Metilglicol; Metanol; Dimetilacetamida (DMA); Propilenoglicol; Etilenoglicol; Cloreto de Potássio; Glicerol; Citrato e outros (SALMITO-VANDERLEY et., 2014; VIVEIROS et al., 2011; MARTÍNEZ; TARAZONA-MORALES; PARDO-CARRASCO, 2012).

Já os crioprotetores externos, atuam recobrando a membrana celular e estabilizando a mesma, além de reintegrar fosfolípidios dos espermatozoides que foram desnaturados durante o choque térmico e servindo como fonte de ATP (MURGAS et al., 2007; SALMITO-

VANDERLEY et al., 2012). Diversos são os crioprotetores adotados na prática de preservação espermáticas para peixes, como; a gema de ovo e o leite em pó desnatado. A ação protetora destes está relacionada respectivamente com, a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema e a caseína do leite (NAVARRO; VELASCO SANTAMARÍA; CRUZ CASALLAS, 2004, CAROLSFELD; HARVEY, 1999), outros crioprotetores externos também foram usados na preservação de espermatozoides de peixes, como, ACP (água de coco em pó), glicose e BTS (Beltsville Thawing Solution®)(GODINHO; DA CUNHA AMORIM; PEIXOTO, 2003; PINHEIRO et al., 2016b).

3.5 Toxicidade

Os crioprotetores são adicionados ao meio diluidor, com o objetivo de proteger as células espermáticas durante o processo de criopreservação, seja no congelamento ou descongelamento (SQUIRES et al., 1999). Tais substâncias devem possuir o potencial tóxico reduzido e alta solubilidade em água, assim atuarão promovendo uma maior tolerância dos espermatozoides às baixas taxas de temperaturas (MARIA, 2005).

A seleção de um crioprotetor está relacionada ao seu potencial tóxico, permeabilidade na membrana celular, solubilidade na água durante o congelamento (SALMITO-VANDERLEY et al., 2015; JAMIESON E LEUNG, 1991), e as características seminais. Estas variam de acordo com as ordens, famílias e espécies, como relatado para os Chaciformes, em que o DMSO e o Metilglicol indicaram resultados satisfatórios (NINHAUS – SILVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA 2007; VIVEIROS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2010), já para os Siluriformes, o crioprotetor usual que apresentou bom desempenho foi o metanol (VIVEIROS; SO; KOMEM, 2000; CAROLSFELD et al., 2003; LANG; CHANDLER; TIERSCH, 2003).

O potencial tóxico dos crioprotetores foi revelado e indicado que o uso em altas concentrações tem eficiência tóxica (LEUNG, 1991; FAHY, 1986). Diante disso, a manipulação de soluções crioprotetoras, deve ser realizada com cautela, em baixas concentrações e a exposição das células espermáticas deve ocorrer de forma imediata e com rápidas taxas de resfriamento (VAJTA et al., 1998).

A toxicidade do crioprotetor pode ter relação espécie-específico, em que a adição de um mesmo crioprotetor ao sêmen, pode provocar taxas de motilidade altas em algumas espécies, baixas ou nulas em outras (BEDORE, 1999). O efeito distinto do crioprotetor nas espécies está diretamente relacionado às características biofísicas de cada uma, relacionadas ao volume celular, volume de água, superfície celular e permeabilidade da membrana celular (CURRY et al., 1996; HOLT, 2002), gerando respostas diferenciadas para cada crioprotetor.

Do mesmo modo que o aumento da concentração do crioprotetor pode ser tóxico para os mamíferos, assim ocorre em teleósteos, essa toxicidade é identificada através das reduções drásticas de motilidade, comprometendo o processo de criopreservação (LEITE, 2019).

A influência do aumento na concentração do crioprotetor e seu poder tóxico, foi avaliado por outros autores em estudo com diferentes espécies de peixes, *Leporinus macrocephalus* (RIBEIRO; GODINHO, 2003a), *Brycon amazonicus* (CRUZ CASALLAS; MEDINA ROBLES; VELASCO SANTAMARÍA, 2006), *Pseudoplatystoma fasciatum* (ARCINIEGAS, P.; RODRÍGUEZ, M. M.; CRUZ-CASALLAS, J, 2005), *Ictalurus punctatus* (CUEVAS-URIBE et al., 2011).

Dentre os crioprotetores utilizados nos estudos de preservação e armazenamento espermático o DMSO é um dos menos tóxico (GWO; JAMIESON; LEUNG, 2009), enquanto que o metanol o mais tóxico, com exceção para o sêmen de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (HARVEY, 1983).

Um crioprotetor eficiente segundo Kasai, (1996) apresenta baixa toxicidade, com rápida capacidade de penetração, simplificando o período de exposição das células ao crioprotetor durante o período crítico de temperatura, evitando oscilações osmóticas.

3.6 Refrigeração

A preservação de sêmen a curto prazo, é uma técnica que tem como principal objetivo manter a viabilidade espermática por um curto período de tempo (horas ou dias) em temperatura de refrigeração (4°C) (SILVA; KUHNEN; SANCHES, 2018). A refrigeração trata-se de uma importante ferramenta para protocolos de reprodução em peixes, favorecendo o sucesso da propagação artificial para diversas espécies (SANCHES; CERQUEIRA, 2010b).

Esta alternativa de baixo custo pode facilitar o momento da reprodução, dispensando a presença dos machos e concentrando as atividades de manejo apenas nas fêmeas, especialmente no monitoramento da ovulação, contribuindo na eficácia do procedimento de reprodução (CARNEIRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007a).

O armazenamento do sêmen *in natura* na refrigeração pode ser realizado sem diluição e com diluição em uma solução imobilizadora (LEGENDRE; LINHART; BILLARD, 1996), assim é relevante o uso de diluidores, que têm a função de fornecer aos espermatozoides um meio protetor, além de nutrientes as células (SILVA; KUHNEN; SANCHES, 2018). A diluição também favorece um melhor meio de acondicionamento para as células espermáticas, diminuindo a competição por oxigênio e espaço entre as células (SANCHES; OLIVEIRA e SERRALHEIRO, 2009).

Alguns cuidados devem ser considerados ao aplicar esta técnica como, redução de temperatura, fornecimento e troca de gases, controle relacionado ao desenvolvimento bacteriano e evitar a desidratação, são aspectos relevantes que irão permitir sucesso na refrigeração (PEÑARANDA et al., 2010).

Técnicas de preservação de sêmen a curto prazo já vêm sendo empregadas há tempos em várias espécies de peixes. Diversos estudos têm sido desenvolvidos com espécies que apresentam interesse comercial como, *Ephinephelus marginatus* (SILVA; KUHNEN; SANCHES, 2018), *L. synagris*(SANCHES; CERQUEIRA, 2010), *B. natereri* (OLIVEIRA et al., 2007), *Rhamdia quellen* (CARNEIRO et al., 2006) e *P. lineatus* (ORFÃO et al., 2010). Diante disso é necessário os protocolos de refrigeração, desde o desenvolvimento de diluentes espécie-específico, com o objetivo de garantir melhores resultados na preservação da viabilidade das células espermáticas, além de padronizar os protocolos de refrigeração e criopreservação para diferentes espécies de peixes (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Área de captura do plantel experimental

Os espécimes de cangati *T. galeatus* foram capturados no município de Arari - MA (Latitude: 03° 30' 25,88181" S Longitude: 44° 45' 34,99587" W), que integra a micro região da Baixada Maranhense, esta apresenta elevada importância ecológica por meio de suas planícies inundáveis, fornecendo atividades ecológicas fundamentais para a manutenção biológica da fauna e flora e contribuindo como fonte de biodiversidade no desenvolvimento de espécies aquáticas e terrestres dessa região alagável (COSTA-NETO et al., 2002).

Em função da grande produtividade e diversidade biológica, essa região é uma área internacionalmente estratégica para conservação biológica das zonas úmidas do planeta, considerada um dos 11 sítios brasileiros que integram a Convenção de RAMSAR (RAMSAR CONVENTION ON WETLANDS, 2002), que caracteriza áreas como unidades de conservação, em função de sua importância ecológica (MATTHEWS, 1993).

Os animais utilizados nesta pesquisa foram capturados com rede de arrasto em uma área alagável com vegetação flutuante e cercada por floresta de babaquais. Os peixes foram estocados em sacos plásticos contendo 1/3 de água do ambiente e 2/3 de oxigênio e então transportados até o sistema de cultivo do Laboratório de Reprodução de Recursos Aquáticos, localizado na Universidade Estadual do Maranhão- UEMA. No sistema de cultivo, os animais

foram aclimatados e estocados em tanques de alvenaria, com aeração constante. Durante o cultivo, receberam ração comercial (36% de proteína bruta), uma vez ao dia *ad libitum*.

Coleta do material

Durante o período reprodutivo, em sistema de cultivo foram selecionados 20 machos com comprimento médio de 10,7 cm (SOUSA et al., 2016). O sêmen foi coletado através de massagem no sentido ântero - posterior. A coleta do material foi feita no gonopódio com auxílio de seringas graduadas. Imediatamente após a coleta, uma alíquota de sêmen foi depositada sobre lâmina de microscopia e observada ao microscópio de luz convencional, para certificar ausência de contaminação, que pode ocorrer durante a coleta, em caso de contato do sêmen, com urina, fezes, água do tanque ou muco. Constatada a motilidade dos espermatozoides, amostras, livres de contaminação, foram conservadas em refrigeração (4 °C) em caixa isotérmica contendo gelo.

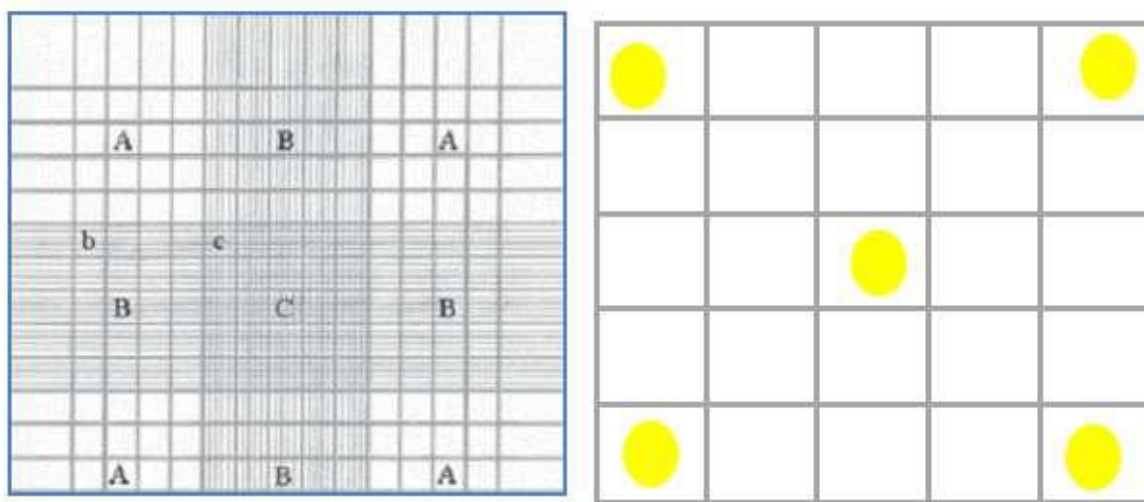
Caracterização do sêmen

Os parâmetros analisados foram:

- **Cor do sêmen:** A coloração do sêmen foi avaliado de acordo com Matavelli et al. (2007), que adotam um escore de 1 a 3, onde o número 1 representa a coloração branca-leitosa, o número 2, a coloração branca-aquosa e o número 3 a coloração amarelo-cítrica.
- **pH do sêmen:** uma alíquota de sêmen foi depositada sobre a fita indicadora de pH e foi avaliado visualmente por meio da escala de 0 a 14 (Neutralit ®).
- **Volume do sêmen (µL):** O volume foi coletado através de seringas graduadas de 5 mL, o volume coletado foi posteriormente transferido para microtubos e mensurado em µL.
- **Motilidade espermática:** Para avaliação da motilidade foi utilizado 2µL de amostra de sêmen e verificado em microscópio de luz (ZEISS, Primo Star) (200X), por uma única pessoa, em um campo de visão selecionado aleatoriamente e com intensidade de luz constante. A porcentagem de células móveis (%MC) foi feita subjetivamente utilizando uma escala com valores de 0 a 5), onde: 0 = 100% de espermatozoides imóveis, e 1 = 0– 20%; 2 = 20–40%; 3 = 40–60%; 4 = 60–80%; 5 = 80–100% de espermatozoides móveis (SALIBURY; VANDERMARK; LODGE, 1978; OLIVEIRA et al., 2007).
- **Concentração espermática:** O sêmen coletado foi fixado, em solução de formol salino (1%), na proporção de 1µL de sêmen para 500µL de solução. Uma alíquota de 10µL dessa solução foi transferida para a câmara de Neubauer e focalizada ao microscópio com aumento de(400x,

ZEISS PRIMO STAR) onde permaneceu em repouso por cinco minutos. A contagem dos espermatozoides foi realizada no quadrante de contagem C da câmara, nos cantos e no centro de cada retículo (Fig. 4). A contagem dos espermatozoides foi feita em três repetições por amostra (LEITE et al., 2013).

Figura 4. Detalhes de uma câmara de Neubauer (esquerda). Esquema de contagem dos espermatozoides nos cantos e no centro da câmara de Neubauer (direita).



Fonte: Teixeira (2013)

A concentração espermática foi calculada de forma semelhante ao recomendado pelo CBRA (1998), segundo a equação:

$$CSPZ(SPZ.mL^{-1}) = \left(\frac{\sum SPZ}{10q.c.} \right) \times \frac{25q.t \times diluição \times 100}{profundidade \text{ da câmara } mm}$$

Em que: SPZ- espermatozoides; $\sum SPZ$ - número total de espermatozoides contados; q.c- quadriculas contadas; q.t- quadriculas totais; profundidade da câmara- 0,10 mm e diluição= fator de diluição do sêmen pelo fixador; CSPZ- Concentração de espermatozoides.

- **Morfologia dos espermatozoides:** Amostras de sêmen de 20 machos, foram diluídas em solução de formol 1% na proporção de 1 μ L de sêmen para 500 μ L de diluente, 10 μ L desta amostra foi depositado sobre uma lâmina e em seguida coberto por lamínula. A metodologia utilizada foi “preparação úmida” conforme protocolo de Miliorini et al. (2011). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de contraste de fase EVOS_{fl} (*Advanced Microscopy*

Grupo, Bothell WA), na objetiva de 100x sob óleo de imersão. A varredura da lâmina foi concluída quando a contagem total atingia 200 células. A classificação das anomalias espermáticas foi adaptada da técnica aplicada por Miliorini et al. (2011) e Kavamoto (1999), ambos para *P. lineatus*. As anormalidades nos espermatozoides foram identificadas e classificadas como primária ou secundária, em que anormalidades primárias estão associadas a alterações decorrentes do processo de espermatogênese e secundárias decorrentes da técnica de fixação ou esfregaço, as anormalidades estão descritas na (tabela 2). Os dados foram obtidos por meio da soma total das alterações identificadas, que foram apresentadas neste estudo em valor percentual total.

Tabela 2: Descrição das anomalias analisadas em espermatozoides de cangati *T. galeatus*

<i>Origem do dano</i>	<i>Tipo de dano</i>	<i>Descrição</i>
Primário	Defeito na cabeça (DC)	Espermatozoide apresentando cabeça grande e cabeça pequena respectivamente
	Cauda fraturada (CF)	Cauda com fratura ou ausência da porção final
	Cauda fortemente dobrada (CFD)	Cauda enrolada em si mesma
	Cauda em formato retroaxial (RT)	Cauda em sentido oposto a cabeça.
	Cauda enrolada na cabeça(CEC)	Cauda enrolada ao redor da cabeça
Secundário	Cabeça sem cauda (CSC)	Cabeça normal livre, sem alteração na forma.
	Cauda dobrada (CSD)	Todas as dobras da cauda, exceto as enroladas em si mesma.

Fonte: (adaptado pelo autor) Miliorini et al. (2011)

4. 4 Refrigeração

Para o teste de toxicidade foram utilizadas amostras de sêmen de cinco peixes que representaram as repetições dos tratamentos. Cada amostra foi diluída em Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS) acrescida do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações, resultando em cinco tratamentos:

- a) (sêmen *in natura*)
- b) HBSS
- c) HBSS + DMSO 2,5%
- d) HBSS + DMSO 5,0%
- e) HBSS + DMSO 10,0%

O sêmen foi diluído na proporção de 1:4 depositado em microtubos graduados e imediatamente armazenados em refrigeração a 4°C.

A avaliação foi realizada após a diluição nos tempos (T0), 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, quando foi analisada a taxa de motilidade das células espermáticas por meio de avaliação subjetiva.

4.5 Análise estatística

Os valores em porcentagem foram transformados para arco-seno (y)^{0,5}. As médias foram analisadas pela Análise de Variância (ANOVA), e quando encontradas diferenças significativas entre as médias foi aplicado o teste de Tukey. Os dados foram expressos em médias \pm desvio padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica versão 7 em nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do sêmen

O sêmen do cangati apresentou coloração branca e aspecto leitoso, correspondendo ao escore 1; sem variação de pH entre os espécimes, enquanto que o volume variou 66,6% entre as amostras. A taxa de motilidade foi de 90,6% e a concentração de $2,7 \times 10^6$ células mL⁻¹. (Tabela 3).

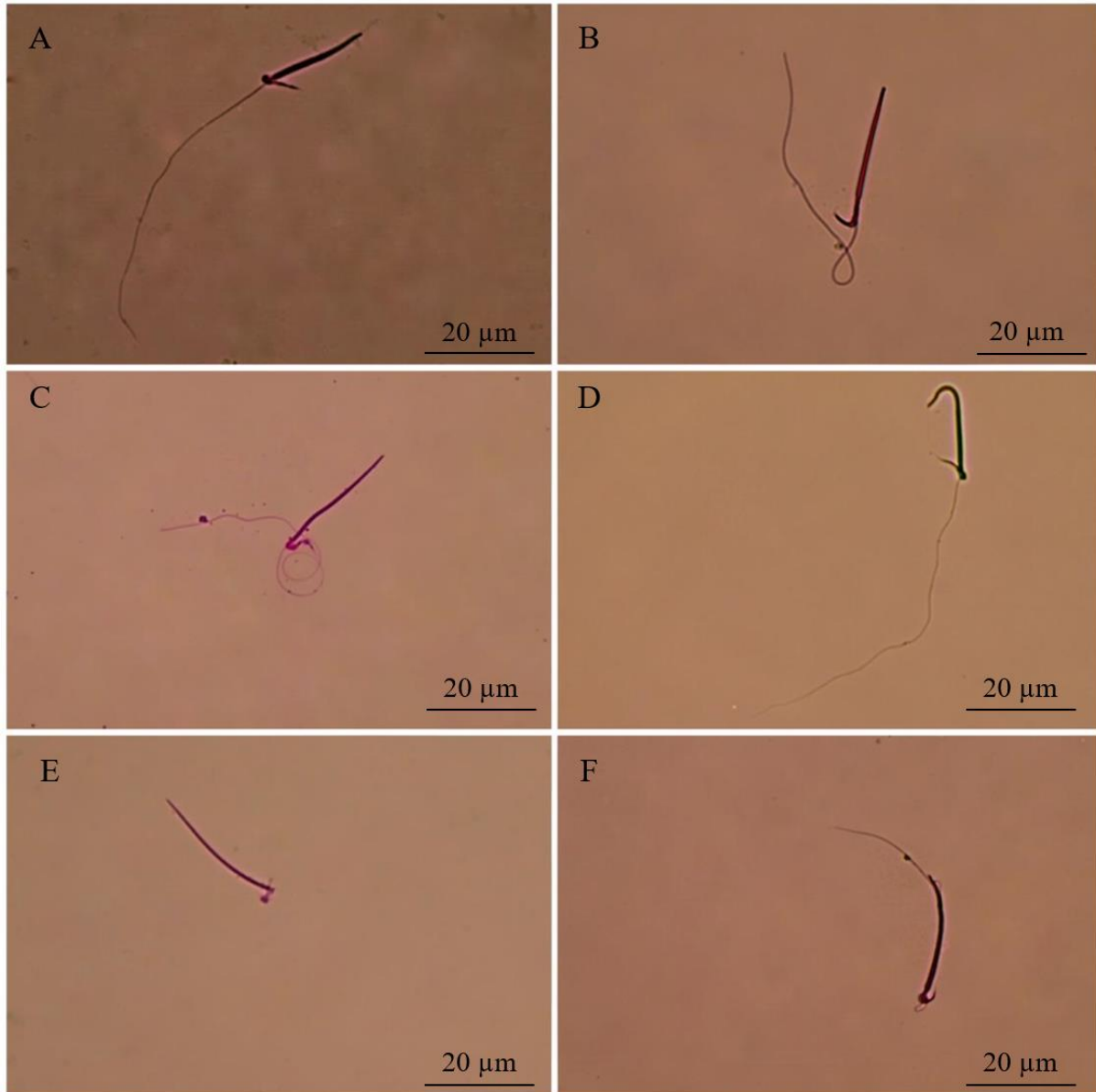
Tabela 3. Parâmetros espermáticos de *Trachelyopterus galeatus* (n=20) cultivado no Maranhão - Brasil.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação(%)
Coloração/Aspecto	Branco leitoso (1)	-	-
pH	6	0	0
Volume μ L	392,3	261,5	66,6
Motilidade espermática (%)	90,6	13,4	14,8
Conc. espermática ($\times 10^6$ sptz mL ⁻¹)	2,7	0,7	25,6
Espermatozoides normais (%)	70,64	0,61	18,1
Anormalidades primárias (%)	14,21	0,34	2,39
Anormalidades secundárias (%)	15,14	0,36	2,37
Total de Anormalidades (%)	29,35	0,65	4,47

Fonte: O autor (2020)

A morfologia espermática de *T. galeatus* indicou 70,64% de espermatozoides normais: cabeça alongada, sem acrossoma, um apêndice distal a cabeça e um único e longo flagelo (Figura 5- A). As anormalidades mais frequentes nos espermatozoides da espécie do presente estudo, estão indicados na figura 5. O percentual de danos nas células verificadas, para primários foi 14,21% e secundários foi de 15,14%.

Figura 5- Micrografia de contraste de fase, apresentando morfologia e indicando as principais anomalias nos espermatozoides de *T. galeatus* (100 X). (A) normal, (B) cauda dobrada, (C) espermatozoide com cauda fortemente dobrada, (D) defeito na cabeça (irregularidade da membrana), (E) espermatozoide sem cauda (F) cauda enrolada na cabeça.



Fonte: O autor (2020)

Nas amostras de sêmen *in natura* avaliadas, foram identificadas anormalidades tanto na cabeça quanto na cauda dos espermatozoides, esta última em maior frequência (Tabela 4).

Tabela 4. Principais danos identificados no sêmen *in natura* de *Trachelyopterus galeatus* cultivado no nordeste do Brasil.

<i>Natureza da patologia</i>	<i>Tipo de alteração</i>	<i>Frequência e Desvio padrão</i>	<i>Total</i>
1^a	Cauda dobrada	12, 45 ± 0,32	14,21
	Cauda. Fort. Dobr	4,90 ± 0,15	
	Retro axial	3,09 ± 0,13	
	Cauda. Enrol. Cabeça	1,14 ± 0,05	
	Def. Cabeça	3,5 ± 0,16	
2^a	Cauda quebrada	1,57 ± 0,09	15,28
	Sptz sem cauda	2,54 ± 0,11	
	Sptz gota citoplasmática	0,14 ± 0,01	
Total de anormalidades (%)			29,49

Fonte: O autor (2020)

5.2 Refrigeração

Para o teste de refrigeração, o sêmen *in natura* de cangati *T. galeatus* preservado a 4°C, indicou resultado satisfatório, pois manteve a qualidade e viabilidade espermática por 48 horas, com motilidade espermática final de 35%. A motilidade declinou à medida que o tempo de armazenamento aumentou, assim como o incremento na concentração do DMSO resultou na redução gradativa da porcentagem das células móveis (Tabela 5).

Foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$), entre os intervalos de tempo do sêmen diluído em HBSS para taxa de motilidade, em que a partir do intervalo de 12 horas, os espermatozoides estavam completamente inativos. O mesmo acontecendo para HBSS + DMSO (10%).

Tabela 5. Porcentagem de motilidade (%; média e erro padrão) dos espermatozoides de cangati (*Trachelyopterus galeatus*; n=5) estocados durante 72 horas a 4° C *in natura*, diluído com HBSS e diluído com HBSS + DMSO em diferentes concentrações (2,5%, 5,0% e 10%) n=5.

Tratamentos	Intervalo(s)						
	0	12hrs	24hrs	36hrs	48hrs	60hrs	72hrs
Sêmen não diluído	80±8,1 ^{aAB}	65±15 ^{aA}	57,5 ± 17,5 ^{abA}	40 ± 14,7 ^{abA}	35 ± 8,6 ^{abA}	20 ± 4,0 ^{abA}	10 ± 4,0 ^{bA}
HBSS	72,5±10,3 ^{aAB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}
HBSS + DMSO (2,5%)	87,5 ± 2,5 ^{aA}	65 ± 8,6 ^{abA}	60 ± 8,1 ^{bcA}	45 ± 5,0 ^{bcdA}	35 ± 5 ^{cdA}	30 ± 4,0 ^{dA}	20 ± 4,0 ^{dA}
HBSS + DMSO (5%)	72,5 ± 2,5 ^{aAB}	70 ± 7,0 ^{aA}	60 ± 8,1 ^{acA}	37,5 ± 10,3 ^{abcA}	37,5 ± 10,3 ^{abcA}	27,5 ± 7,5 ^{bcA}	20 ± 7,0 ^{bA}
HBSS + DMSO (10%)	55 ± 8,6 ^{ab}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}	0 ± 0 ^{bB}

Letras minúsculas distintas representam diferença significativa entre colunas (intervalos) e letras maiúsculas distintas representam diferença significativa entre linhas (tratamentos) ($p < 0,05$).

Logo após a diluição (T0), a motilidade espermática apresentou menor taxa somente para o tratamento HBSS + DMSO 10% quando comparado ao HBSS + DMSO 2,5%, sem diferença entre os demais tratamentos. Os tratamentos HBSS e HBSS + DMSO 10% não apresentaram motilidade após intervalo de 12 horas (T12). Os demais tratamentos permaneceram com taxas de motilidade semelhante ao longo do experimento e com porcentagem de células móveis viáveis para metodologias de preservação após 48 horas, em que o tratamento HBSS + DMSO 2,5% (35±5), apresentou melhor desempenho.

6.0 DISCUSSÃO

A coloração branca e o aspecto leitoso do sêmen do cangati, indicou escore 1 conforme classificação de Mataveli et al.(2007), que pode estar relacionada com a elevada concentração espermática ou mesmo associada ao pH. Mojica (2004), verificando a qualidade seminal de três espécies de peixes tropicais; *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii*, identificaram variação na coloração do sêmen coletado; amarelo aquoso, branco-cremoso e esbranquiçado leitoso, respectivamente para estas espécies. Assim, comprovou que a coloração do sêmen estava diretamente associada a concentração espermática, indicando que quanto mais cremoso o sêmen, maior foi a concentração espermática.

Para a espécie em estudo a concentração espermática foi baixa, embora o sêmen tenha apresentado coloração indicadora de alta concentração - escore 1. Esta contradição pode ser justificada pelo formato do espermatozoide que possui uma cabeça bastante alongada além de uma estrutura filamentar na base da cabeça. Essas características podem ter colaborado para maior adensamento do líquido seminal. O alongamento da cabeça do espermatozoide de *T. galeatus* está associado a dinâmica reprodutiva, pois de acordo com Grier, 1981; Billard 1970; Ginzburg 1972, em peixes de fertilização externa, as células espermáticas possuem cabeça arredondada, enquanto que espécies de fertilização interna possuem a cabeça alongada. Este alongamento identificado nos espermatozoides de *T. galeatus*, indica que tal morfologia ocorre com o objetivo de facilitar a passagem dos espermatozoides pelo gonopódio lobular dos machos e nas estruturas labirínticas das fêmeas.

A coloração do sêmen de peixes, geralmente associada à concentração, pode apresentar alterações em função do peso, da idade, do período reprodutivo, frequência de coleta e do volume coletado (SOLIS-MURGAS et al., 2011; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

A baixa concentração espermática registrada pode estar relacionada ao modo reprodutivo de *T. galeatus*, que é uma espécie de fertilização interna que realiza cópula para a reprodução (CHIARINI-GARCIA; VIEIRA; GODINHO, 2014). Essa dinâmica reprodutiva

caracteriza menor desperdício de material fecundante necessitando de uma menor quantidade de células, já que o epitélio germinativo das fêmeas mantém os espermatozoides com viabilidade durante um certo período de tempo (MUÑOZ et al., 2000; PARREIRA et al., 2009; VILA et al., 2007), em que as células espermáticas não são expostas há estresse osmótico externo em um meio circundante (TABORSKY, 1998).

As adversidades do meio reprodutivo, ou seja, o ambiente onde os gametas são liberados, podem contribuir para uma maior dispersão do material fecundante, assim um sincronismo entre as condições endógenas e exógenas do meio ambiente são importantes no momento da liberação dos gametas (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007). Ambientes lênticos como os reservatórios ou um ambiente com correnteza fluvial, possuem diferentes dinâmicas que atuam na maturação das gônadas dos peixes e conseqüentemente estimulam a reprodução das espécies que ali habitam (GODOY, 1975). Nesse sentido, a dispersão e quantidade de material fecundante nesses ambientes podem ocorrer de maneira diferenciada.

Outros autores também identificaram baixa concentração espermática em espécies de fertilização interna, Pavlov; Rodzikhovskaya (1991), identificaram concentração de 0,07 a $4,4 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ para o lobo marinho (*Anarhichas lupus*), para a espécie marinha *Macrozoarces americanus*, a concentração espermática variou de $7,56 \times 10^6$ a $2,15 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (YAO et al., 1995). Estas baixas concentrações podem ser compensadas, provavelmente, pelo número de micrópilas presentes nos ovócitos que para estas espécies é de cinco a duas respectivamente (DZERZHINSKY et al., 1992; YAO; CRIM, 1995), uma adaptação para potencializar a fertilização dos ovócitos em função da baixa densidade espermática identificada. Baixa concentração espermática também foi verificada em *Xiphophorus helleri*, peixe ornamental, com a mesma dinâmica reprodutiva, Huang et al., 2004 verificou concentração de $5 \times 10^7 \text{ cel/mL}^{-1}$.

Por outro lado, espécie que fertilizam em ambiente externo apresentam valores de densidade espermática superiores ao relatado neste estudo, bagres como o jundiá (*Rhamdia quelen*) e o suruvi (*Steindachneridion scripta*) indicaram variações na concentração espermática de $24,6$ a $138,9 \times 10^6$ e $19,5$ a $120,1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (FERREIRA et al., 2001; LUZ et al., (2001). Em esturção (*Acipenser baerii*), Cosson et al. (2000), também identificaram variação na concentração espermática de $0,1$ a $4 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$.

No presente estudo a variação na densidade espermática (25,6%) entre os espécimes, pode estar associada a fatores como o estado de maturação das gônadas, interferências

genéticas, manejo e qualidade nutricional. Estes fatores indicam variações particulares dos parâmetros seminais entre as espécies (CABRITA et al., 2014; SUQUET et al., 2000; VALDEBENITO; GALLEGOS e EFFER, 2015).

Em estudos de qualidade seminal, variações individuais são frequentemente relatadas (RANA, 1995). Neste estudo, foi observada uma grande variação no volume do sêmen $392,3 \pm 261,5 \mu\text{L}$), equivalente a 66,6%, resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies de peixes dulcícolas, como: *Perca fluviatilis*, de 550 a 6780 μL (ALAVI et al., 2010); *Acipenser persicus*, de 20000 a 50000 μL (ARAMLI; KALBASSI; NAZARI, 2015); *Prochilodus lineatus*, de $3500 \pm 700 \mu\text{L}$ (FERREIRA et al., 2001); *Brycon orbignyanus* de $5850 \pm 3620 \mu\text{L}$ (ORFÃO et al., 2010); e *Rhamdia quelen*, 410 μL (MOJICA, 2004).

Para o cangati o valor médio de pH registrado para as amostras analisadas foi 6.0 ± 0 , valor semelhante foi encontrado no plasma seminal do esturjão (*Acipenser persicus*) no início de sua motilidade (ADI ALAVI et al., 2004), enquanto que em salmonídeos o pH foi superior, 7,5 a 8,5 (ALAVI; COSSON, 2005; FIGUEROA et al., 2018).

Espécies de água doce é comum o pH variar entre 6,5 a 8,5 (VIEIRA et al., 2011), como registrado para *Prochilodus lineatus* $7,8 \pm 0,4$ (ORFÃO et al., 2010); *Prochilodus brevis* $8,39 \pm 0,12$ (NASCIMENTO et al., 2017) e *Oncorhynchus mykiss* 8,0 (UBILLA et al., 2015).

O pH está diretamente relacionado as condições externas como a salinidade e temperatura, as quais possuem importante papel na fisiologia das células espermáticas, porém cada espécie apresenta valores específicos para este parâmetro (ARAL et al., 2007; BILLIARD et al., 1995), que tem papel importante no início da motilidade espermática (MOJICA, 2004). Vale ressaltar que os espermatozoides de *T. galeatus* são móveis dentro dos testículos e após a passagem pelo ducto espermático também, dispensando assim soluções ativadoras, sugerindo que as células epiteliais do trato reprodutivo feminino, podem controlar a motilidade e regular o pH do sêmen.

Outra característica importante que define a qualidade espermática é a porcentagem de células móveis (VIVEIROS; GODINHO, 2009), pois está relacionada ao potencial de fertilização do animal (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010). Neste estudo as amostras avaliadas indicaram porcentagem satisfatória de células móveis ($90,6 \pm 13,6 \%$). Em outras espécies de fertilização interna, foi verificada variação no percentual de células móveis. *X. helleri*, Huang et al. (2004), observaram que após extração dos testículos e adição de solução salina balanceada de Hanks (HBSS), antes da compressão dos testículos, usual para liberar os espermatozoides, os autores verificaram que a motilidade média foi de 67%, inferior ao que foi

relatado para o cangati. *Anarhichas lupus*, conhecida popularmente como lobo marinho, em estudo desenvolvido por Pavlov; Moksness, (1993) apresentou motilidade no plasma seminal e as células espermáticas mantiveram-se móveis durante vários dias em temperaturas próximas a 0 °C. *Macrozoarces americanus*, após criopreservação apresentou motilidade média de 50 a 70% (YAO et al., 2000).

A motilidade dos espermatozoides da espécie em estudo foi considerada atípica, quando comparado com teleósteos que fertilizam externamente, uma vez que apresentaram motilidade durante e após a coleta, mantendo-se móveis por 48 horas, eliminando a necessidade do uso de soluções ativadoras, em caso de uso imediato ou sob refrigeração.

A boa qualidade do sêmen *in natura* de *T. galeatus* observada neste estudo, por meio da porcentagem de espermatozoides móveis, foi semelhante ao verificado para algumas espécies de fertilização externa: *Rhamdia quelen* $91,6 \pm 4,08\%$ (MOJICA, 2004), *Acipenser persicus* 90 a 100% (COSSON et al., 2000) e *Clarias gariepinus* 70 a 90% (MANSOUR; LAHNSTEINER; PATZNER, 2002).

A boa qualidade da motilidade espermática, do vigor espermático e o sucesso da fertilização podem estar relacionados a boa morfologia dos espermatozoides (DREANNO et al., 1999; LAHNSTEINER et al., 1998; ARRUDA et al, 2015). A média percentual de espermatozoides normais encontrados neste trabalho foi de $70,64 \pm 0,61\%$ o que está diretamente relacionado boa qualidade do sêmen *in natura* da espécie. Galo et al.(2011), encontraram valores inferiores, $62,20\% \pm 17,86$ em piracanjuba (*B. obgnyanus*), valor mais baixo foi registrado para Streit Jr. et al.(2009), avaliando o efeito do congelamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), observou redução na frequência de espermatozoides normais ($40, 21 \pm 15,28\%$) para ($31,50 \pm 12,30\%$) pós congelamento.

De forma geral, os espermatozoides de teleósteos são divididos morfologicamente em cabeça, peça intermediária, cauda e não possuem acrossoma, a ausência deste é compensada pela presença da micrópila, um orifício dos ovócitos que facilita a penetração do espermatozoide (COSSON et al., 1999; LAHNSTEINER; PATZNER, 2008).

A ocorrência de anormalidades morfológicas nas células espermáticas, estão associadas a fatores como nutrição, idade dos reprodutores, métodos de coleta e coloração adequado para análise e identificação das anormalidades (GRACIA, 2011). A maior frequência de anormalidades aconteceu para a cauda dobrada ($12,56 \pm 0,32\%$) o que pode ter interferido na taxa de motilidade espermática refletindo nos 10% de espermatozoides imóveis registrados. Da

mesma forma, Fernandes et al. (2020), identificando as anomalias espermáticas em sêmen *in natura* de *Prochilodus lacustris* verificou alterações associadas a cauda como mais frequentes.

As alterações associadas a cauda, estão relacionadas a distribuição de mitocôndrias da peça intermediária e cauda, portanto causam alterações crescentes na motilidade, influenciando o aumento de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios (BLOM, 1959).

A elevada presença de defeitos em amostras de sêmen *in natura* de qualquer espécie inviabiliza sua utilização em protocolos de refrigeração ou congelamento uma vez que os espermatozoides ainda sofrerão as possíveis injúrias dos processos, resultando em material, provavelmente, de má qualidade (BUCHER et al., 2009).

Os espermatozoides de *T. galeatus* não diluídos apresentaram viabilidade em até 60 horas após refrigeração, com $30 \pm 4,0$ %. Uma motilidade com percentual mínimo de 30% de atividade espermática é indicada para protocolos de fertilização (MARQUES; GODINHO, 2004).

A viabilidade do sêmen *in natura* mantido sob refrigeração já foi comprovada para várias espécies, em diferentes intervalos de tempo, resultados, e com peculiaridades para cada espécie, além da presença de interferências extrínsecas (CARNEIRO et al., 2006), estes mesmos autores, verificaram a viabilidade do sêmen *in natura* do jundiá (*R. quelen*) durante 12 dias, quando ao final apresentou motilidade de 15,5%. Oliveira et al. (2007a) desenvolvendo protocolos de refrigeração para o sêmen de pirapitinga (*B. nattereri*) observaram motilidade de 39 ± 20 % após 72 horas de refrigeração do sêmen *in natura*. Já Shaliutina et al.(2013), para o esturjão (*Acipenser baeri*),verificaram motilidade superior a 50% durante 6 dias de armazenamento em 6°C.

A utilização do HBSS como diluidor não apresentou diferença significativa na porcentagem de células móveis quando comparado com o sêmen *in natura* ($p > 0,05$). É comum o uso do HBSS com sucesso, Tiersch et al. (2004) adotou o uso do HBSS associado ao NaCl na refrigeração de sêmen de *Centropomus undecimalis* e observou motilidade média de 50% por 9 dias. No sêmen de *Mugil liza*, o HBSS aumentou o tempo de motilidade espermática em 20%, após 18h de refrigeração e manteve a taxa de motilidade espermática por 24 horas (MAGNOTTI et al .2018). O bom desempenho desse diluente está associado a açúcares e sais (CHRISTENSEN; TIERSCH, 2005; PAUL LANG et al., 2003; ARAÚJO, 2012).

As principais funções dos diluentes na refrigeração são; proteger as células espermáticas de alterações bruscas de temperatura evitando danos ao espermatozoide durante o armazenamento (MCNIVEN; GALLANT; RICHARDSON, 1993; UBILLA;

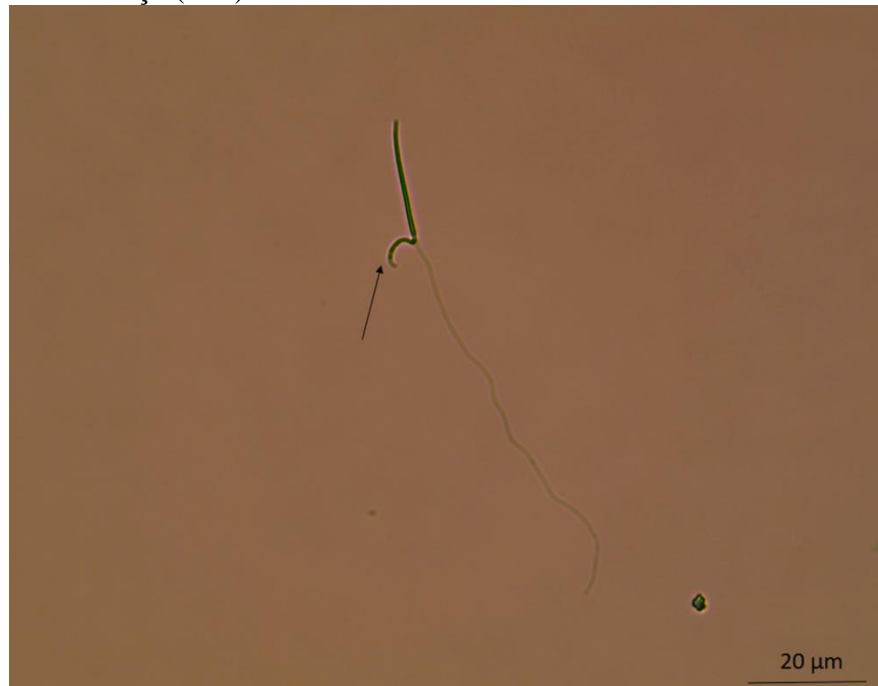
VALDEBENITO, 2011; VALDEBENITO et al., 2009), promover a diluição do sêmen que geralmente apresenta elevada viscosidade e em alguns casos baixo volume (GWO, 2000), evitar a oxidação das membranas mitocondriais e plasma e disponibilizar substratos de energia no meio extracelular (BATELLIER et al., 2001; MORISAWA et al., 1983). Para o cangati, uma hipótese para o resultado obtido com HBSS é que os nutrientes do meio diluidor não tenham sido suficientes para promover o prolongamento da motilidade dos espermatozoides ou que a osmolaridade do diluidor não foi compatível com a do plasma seminal. Yao, Richardson e Crim (1999), obtiveram boa viabilidade espermática de *Macrozoarces americanus*, espécie marinha, de fertilização interna por 5 dias a 4°C, ao adotar diluidor produzido com composição a partir do plasma seminal.

Anteriormente, estes autores ainda verificaram que o plasma seminal dispõe de importantes nutrientes e que 98% da composição deste, eram de reservas de glicose (YAO; CRIM, 1995).

O supracitado sugere que o plasma seminal da espécie apresenta importante papel no fornecimento de nutrientes para a peça intermediária, promovendo energia às mitocôndrias e aumentando o tempo de vida útil do espermatozoide. Neste sentido, a morfologia do espermatozoide de fertilização interna apresenta relação positiva entre as mitocôndrias e a alta disponibilidade de glicose no plasma seminal, pois dispõe de uma extensão notável de mitocôndrias na bainha alongada em torno da região próxima do axonema (JAMIESON, 1989).

Para o cangati, foi possível verificar uma morfologia diferenciada no espermatozoide, a presença de um apêndice na porção final da cabeça, tal estrutura estar associada ao abundante suprimento de energia para o movimento espermático, agindo como uma reserva mitocondrial (Figura 6.) elevando a capacidade de energia da célula (FAWCETT, 1970; BURNS et al., 2002), essencial para propulsão dentro do aparelho reprodutor feminino ou ao armazenamento prolongado dos espermatozoides no ovário (PECIO; RAFIŃSKI, 1994).

Figura 6. Micrografia de contraste de fase indicando espermatozoide de *T. galeatus* com apêndice distal a cabeça (seta)



Fonte: O autor (2020)

Modificações estruturais como a do espermatozoide de *T. galeatus*, foi relatada para outras espécie de fertilização interna como *Hemirhumphodon pogonognathus*, este juntamente com *X. helleri* (HUANG et al., 2004), possuem alongamento do núcleo das células espermáticas, um sistema mitocondrial bem desenvolvido na peça intermediária, além de uma atividade glicolítica comparável a dos mamíferos (STOSS, 1983b; JAMIESON, 1989). Da mesma forma ocorre com *Macrozoarces americanus L.*, espécie marinha de fertilização interna, possui adaptações, como peça intermediária, uma a duas vezes maior que o comprimento da cabeça com numerosas mitocôndrias alongadas e bem desenvolvidas além de ser biflagelado, as adaptações citadas para os espermatozoides de fertilização interna, estão associadas ao longo tempo útil de vida dessas células e a permanências destas no ovário (YAO, EMERSON; CRIM 1995).

Isto sugere que o apêndice identificado no espermatozoide da espécie do presente estudo, pode estar associado ao armazenamento de reservas mitocondriais, favorecendo a intensa atividade espermática já relatada, em que os espermatozoides mantiveram-se móveis durante e após a coleta.

Quanto aos tratamentos formados pelo HBSS acrescido das diferentes concentrações de DMSO, foi observado que o aumento gradativo das concentrações (2,5%, 5,0% e 10,0%) resultou na redução das taxas de motilidade imediatamente após a diluição (T0), porém manteve

viabilidade das células espermáticas por até 48 horas e sem diferença significativa para as concentrações de 2,5% e 5,0%. O uso de uma destas concentrações de DMSO durante a refrigeração do sêmen de cangati não provocou injúrias severas aos espermatozoides provavelmente em função da capacidade do DMSO em eliminar radicais hidroxilas. Esta afirmativa é corroborada por Popham e Novacky (1991), ao afirmarem que o DMSO tem potencial aprótico polar, que possui uma atividade antioxidante, com base em sua capacidade de reagir com espécies reativas nocivas de oxigênio para o radical hidroxila (ROS). O excesso de produção de radicais hidroxilas resulta em danos às membranas plasmáticas e mitocôndrias, levando à redução da motilidade espermática (AITKEN; BAKER, 2006).

O DMSO é um dos crioprotetores menos tóxicos e usual para teleósteos de água doce (LIU et al., 2006; SUQUET et al., 2000), em função da sua alta permeabilidade na membrana celular espermática (VIVEIROS et al., 2014), e por seu teor tóxico ser reduzido em baixas temperaturas (LEUNG, L.K.P. & JAMIESON, 1991). Outros autores também adotaram o uso do crioprotetor associado ao diluente em metodologias de refrigeração: Moraes (2004), adotou o uso de diferentes crioprotetores (DMSO, etilenoglicol, glicerol e metanol) no resfriamento (5 - 8°C) do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) na concentração de 10% por 48 horas e observou redução da motilidade assim que o sêmen foi diluído nas soluções com os crioprotetores (73%), em relação ao tratamento controle (sêmen *in natura*) (91%), semelhante ao que ocorreu no presente estudo, na concentração de 10%. O autor não observou vantagens no uso de crioprotetores internos na solução diluidora, no resfriamento do sêmen de piau (*Leporinus macrocephalus*). Maria (2005), também não identificou vantagens no uso de DMSO, metanol e metil glicol adicionado a diluidores em refrigeração do sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) o uso do DMSO no diluente nas concentrações de 1; 2,5 e 5% mantiveram a atividade espermática por até 5 dias de armazenamento, entretanto após 10 dias as células espermáticas do tratamento de 5% não apresentaram motilidade (UBILLA et al., 2015). Ao final do experimento (13 dias) apenas o tratamento com a concentração de 1% de DMSO, apresentou resultados satisfatórios para a fertilização concluindo que a baixa concentração do crioprotetor reduziu o seu potencial tóxico durante os dias de armazenamento e prolongou a proteção contra o choque térmico.

T. galeatus tem espermatozoides continuamente móveis após coleta. Neste sentido, a incorporação de outras substâncias ao diluidor, como: antioxidantes, aminoácidos, ácidos orgânicos, crioprotetores e outros (MAGNOTTI et al., 2018a), podem melhorar o tempo de estocagem e o desempenho dos espermatozoides durante o armazenamento em refrigeração.

7.0 CONCLUSÃO

- O espermatozoide de *T. galeatus* possui a cabeça bastante alongada e um apêndice distal à cabeça que são adaptações relacionadas a fertilização interna, modo reprodutivo da espécie, tais adaptações auxiliam respectivamente, na passagem dos espermatozoides pelo gonopódio lobular dos machos e armazenamento da reserva mitocondrial.
- O sêmen *in natura* permanece viável por 48 horas em refrigeração a 4 °C.
- O diluidor HBSS (Solução Salina Equilibrada de Hank's) sem crioprotetor não apresenta eficiência no prolongamento da motilidade dos espermatozoides de *T. galeatus* armazenado em refrigeração.
- O DMSO nas concentrações de 2,5% e 5,0% associado ao diluente HBSS mostrou-se eficientes, pouco tóxico, no resfriamento de sêmen por 48 horas. Portanto indica-se este protocolo para a conservação de sêmen de cangati.
- O DMSO a 10% é tóxico para o sêmen resfriado com HBSS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2006.
- ALAVI, S.M.H, RODINA, M., VIVEIROS, A. T.M., COSSON, J., GELA, D., BORYSHPOLETS, S., LINHART, O., Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.), **Theriogenology**, v.72, p.32–43, 2009.
- ALAVI, S. M. H. et al. Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae). **Czech Journal of Animal Science**, 2010.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review. **Cell Biology International**, v. 29, n. 2, p. 101–110, 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. **Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review** **Cell Biology International**, 2006.
- ALAVI, S. M. H., COSSON, J., KARAMI, M., AMIRI, B. M.; AKHOUNDZADEH, M. A. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. **Reproduction**, 2004.
- AMBRULHOSA, F. **Técnico em Piscicultura -Piscicultura**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia no Pará-IFPA. Este caderno foi elaborado em parceria entre o IFPA e a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil. Pará, 2011.
- ANDRADE DR, YASUI, GS. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Rev Bras Reprod Anim**, v.27, p.166-172, 2003.
- ARAÚJO, R.V. **Motilidade; Velocidade e Fertilidade do sêmen de Surubim-do-Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) Criopreservado em diferentes diluidores**. Tese (Doutorado em Zootecnia). 2011.91 p. Universidade Federal de Lavras- MG. 2011.
- ARAÚJO, LRS. **Uso de diluentes alternativos a baixas temperaturas na manutenção da qualidade espermática do sêmen suíno. 2012. 93f**. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.
- ARAMLI, M. S.; KALBASSI, M. R.; NAZARI, R. M. Spermatozoa and seminal plasma enzyme activity in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in relation to short-term storage. **Aquaculture Research**, 2015.
- ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura**. Florianópolis: UFSC, 2004. 231p.
- ARAL, F., SAHINOZ, E., DOGU, Z. A study on the milt quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Ataturk Dam Lake, Southeastern Turkey. **Turk J Fish Aquat Sc** 7, 41-44, 2007.

- ARRUDA RP, CELEGHINI ECC, GARCIA AR, SANTOS GC, LEITE TG, OLIVEIRA LZ, LANÇONI R, RODRIGUES MP. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim* 39:47–60, 2015.
- BACCETTI, B; BURRINI, A. G; GIBERTINI, G; MAZZINI, M.; ZERUNIAN, SFish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven Cyprinid species. **Gamete Research**, 1984.
- BACCETTI, B. News on Sperm Evolution. **Development, Growth & Differentiation**, 1986.
- BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, 2001.
- BEDORE, A. G. **Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122-131, 1992.
- BILLARD, R., COSSON, J., LAURENCE, W. C. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aquat. Living Resour.**, v.6, p.67-75, 1993.
- BILLARD, R., Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, **Reprod. Nutr. Develop.**, v.26, p.877–920, 1986.
- BILLARD, R.. La motilite du spermatozoide de poisson: aspects energetics. In: **5 as Jornadas Internacionales de Reproduccion animal**, Zaragoza. Anais... Zaragoza, Espagne, p.163-186. 1990.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v.129, n.1-4, p.95-112, 1995.
- BOCK, C.; PADOVANI, C. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu. **Acta Scientiarum**, 2000.
- BORGES, S.A.G.V; GURGEL, H.C.B; CANAN, B. Estrutura Populacioanal de *Parauchenipterus galeatus* Linnaeus, 1766 (Siluriformes, Auchenipteridae), da Lagoa Jiqui, Parnamirim, Rio Grande do Norte. **Revista ceres**, Viçosa, 46 (264): 209-218. 1999.
- BOMBARDELLI, R. A. et al. Insemination dose for artificial of grey jundia oocytes, Rhadia quelem (Qoy e Gaimard, 1824), **Revista Brasileira de Zootecnia**, v, 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.
- BLOM, Erik. A rare sperm abnormality: ‘Corkscrew-sperms’ associated with sterility in bulls. **Nature**, v. 183, n. 4670, p. 1280-1281, 1959.
- BLOM E The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med** 25:383–391.1973.
- BRAGA, F. M. S. Reprodução de peixes (Osteichthyes) em afluentes do reservatório de Volta Grande, Sudeste do Brasil. **Iheringia**, 91: 67-74. 2001.
- BURNS, J. R.; MEISNER, A. D.; WEITZMAN, S. H.; MALABARBA, L. R. Sperm and Spermatozeugma Ultrastructure in the Inseminating Catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysii: Siluriformes: Auchenipteridae). **Copeia**, 2002.

- BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KÄHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v.71, p.1180-1185, 2009.
- CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; GAVAIA, P. J.; RIESCO, M. F.; VALCARCE, D. G.; SARASQUETE, C.; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, 2014.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. In: **CURSO de treinamento brasileiro**. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. 47p.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **J. Fish Biol.**, v.63, p.472-489, 2003.
- CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, 2006.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2007.
- CARNEIRO, P. C.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryo-Letters**, 2012.
- CARVALHO, M. A. M.; LINHARES, F. R. A.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. D. M.; DA COSTA, R. B.; SALES, R. D. O. Coconut water as extender for sperm of freshwater fish with external fertilization. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 2014.
- CHIARINI-GARCIA, H.; VIEIRA, F. O.; GODINHO, H. P. Morphofunctional changes of female germinal epithelium to support spermatozoa along the annual reproductive cycle in an inseminating catfish (*Trachelyopterus galeatus*, Auchenipteridae). **Journal of Morphology**, 2014.
- CHACON JO, MENDES FILHO A. Estudo morfológico do aparelho genital de cangati. *Trachycorystes galeatus*, Linnaeus, 1756. **Ciência e Cult** 24:531–536. 1972.
- CHRISTENSEN, J. M.; TIERSCH, T. R. Cryopreservation of channel catfish sperm: Effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. **Theriogenology**, 2005.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) Manual para exame andrológico e avaliação seminal. CBRA, Belo Horizonte
- COSSON, J., BILLARD, R., CIBERT, C., DRÉANNO, C., SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chapter 16, p.162-186.
- COSSON, J., LINHART, O., MIMS, S. D., SHELTON, W. L.; RODINA, M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, 2000.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, 2004.

- COSTA-NETO, J. P. et al. Limnologia de três ecossistemas aquáticos característicos da Baixada Maranhense. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 2002.
- CURRY, Judith A. et al. Overview of Arctic cloud and radiation characteristics. **Journal of Climate**, v. 9, n. 8, p. 1731-1764, 1996.
- CUEVAS-URIBE, R., LEIBO, S. P., DALY, J., & TIERSCH, T. R. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. **Cryobiology**, 63(3), 186-197. 2011.
- CLARO-JR, L., FERREIRA, E., ZUANON, J.; ARAUJO-LIMA, C. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. **Acta Amazonica**, 2004.
- CRUZ CASALLAS, P.; MEDINA ROBLES, V.; VELASCO SANTAMARÍA, Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 2006.
- ROCHA, C. M. C. D., RESENDE, E. K. D., ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, 2013.
- DOURADO, O. F. **Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo DNOCS. Fortaleza**, Convênio Sudene, DNOCS. 40 p. 1981.
- DREANNO, C., COSSON, J., SUQUET, M., CIBERT, C., FAUVEL, C., DORANGE, G.; BILLARD, R. Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1999.
- DZERZHINSKY, K; PAVLOV, D.A. Gametogenesis of White Sea wolffish *Anarhichas Lupus Marisalbi*. **Voprosi Ichthyologii**. 32(2): 107 - 118. 1992.
- DZYUBA V, COSSON J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reprod Biol** 2014;14:165e75.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State Of Food And Agriculture Rome, 2002.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Global aquaculture production statistics 2009. Rome: FAO. 256 p, 2011.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Rome: FAO. 243 p. 2016.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all**FAO. [s.l: s.n.].
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v 23, n.1, p.1-13, 1986.
- FAUVEL, C., SAVOYE, O., DREANNO, C., COSSON, J., SUQUET, M. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, v.54, p.356-369, 1999.
- FAWCETT, D. W. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**.

Supplement. (1970).

FELIZARDO, V. O., MELLO, R. A., MURGAS, L. D. S., ANDRADE, E. S., DRUMOND, M. M.; ROSA, P. V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, 2010.

FERNANDES, J. F. F., FRANÇA, C. L., DE SANTANA, T. C., LOBATO, R. S., & TEIXEIRA, E. G. Contribuição técnica: identificação de anomalias espermáticas no sêmen in natura de curimatã (*Prochilodus lacustris*) (Steindachner, 1907)/Technical contribution: identification of sperm anomalies in the fresh semen of curimatã (*Prochilodus lacustris*)(Steindachner, 1907). **Brazilian Journal of Development**, 6(3), 10418-10431.2020.

FERRARIS JR., C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types.** [s.l: s.n.].

FERREIRA, A. A., de Oliveira NUÑER, A. P., LUZ, R. K., TATAJE, D. A. R., ESQUIVEL, J. R.; RESTREPO, J. B. AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO SÊMEN DO JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto da Pesca**, 2001.

FIGUEROA, E., FARIAS, J. G., LEE-ESTEVEZ, M., VALDEBENITO, I., RISOPATRÓN, J., MAGNOTTI, C.; OLIVEIRA, R. P. S. Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 493, p. 1–8, 2018.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., CESTAROLLI, M. A., GODINHO, H. M., RAMOS, S. M., SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, v.17, p.1-13, 1990.

FONSECA, V. O. et al. Procedimento para Exame Andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 1992.

GALO, J. M., STREIT-JUNIOR, D. P., SIROL, R. N., RIBEIRO, R. P., DIGMAYER, M., ANDRADE, V. X. L.;EBERT, A. R.Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation [Anormalidades espermáticas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) após a criopreservação]. **Brazilian Journal of Biology**, 2011.

GERVASI MG, VISCONTI PE. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology** 2017;5:204e18.

GINZBURG, A. S. Fertilization in Fishes and the Problem of Polyspermy. **Academy of Sciences of the USSR Institute of Development Biology**, 1968.

GINZBURG, A. S. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Israel Program Scientific Translations, Jerusalem. 366 pp. (Academy of Sciences of the USSR, Institute of Development Biology). 1972

GODINHO, H. P.; DA CUNHA AMORIM, V. M.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia- nilótica *oreochromis niloticus*, var. chitralada: Crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2003.

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

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Piracicaba: Franciscana, 1975. 4 v

- GONÇALVES, A. C. S., NASCIMENTO, A. F., COSTA, A. C., LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, 2013.
- GRACIA, L. F. G. **Alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes**. monografia. Curso de medicina Veterinária. Universidade federal do Rio Grande 2011.
- GREVEN H. Structural and behavioral traits associated with sperm transfer in Poeciliinae. In: Uribe MC, Grier HJ, editors. **Viviparous fishes**. New Life Publications; Homestead, Florida: 2005. pp. 147–165.
- GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v. 21, n. 2, p. 345–357, 1981.
- GRIER, H. J.; FITZSIMONS, J. M.; LINTON, J. R. Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in goodeid teleosts. **Journal of Morphology**, 1978.
- GWO, J. C. **Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: A review** **Aquaculture Research**, 2000.
- GWO, J. C.; JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, L. K. P. Live preservation of fish gametes. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**, v. 8, p. 395-484, 2009.
- HARVEY B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture** 32, 313-320. 1983.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, 2000.
- HORVÁTH, Á.; MISKOLCZI, E.; URBÁNYI, B. **Cryopreservation of common carp sperm**. Aquatic Living Resources. **Anais...**2003
- HOLT, WILLIAM V.; HARRISON, ROBIN AP. Bicarbonate Stimulation of Boar Sperm Motility via a Protein Kinase A—Dependent Pathway: Between-Cell and Between-Ejaculate Differences Are Not Due to Deficiencies in Protein Kinase A Activation. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 4, p. 557-565, 2002.
- HUANG, C., DONG, Q., WALTER, R. B.; TIERSCH, T. R. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. **Cryobiology**, v. 48, n. 3, p. 295–308, 2004a.
- HUANG, C., DONG, Q., WALTER, R. B., & TIERSCH, T. R. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. **Cryobiology**, 2004b.
- IBAMA, **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**, Brasília, 174 p., 2008.
- INABA K, MORISAWA S, MORISAWA M. Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. **J Cell Sci**. 1998;111:1105–1115
- INGERMANN, R. L., HOLCOMB, M., ROBINSON, M. L.; CLOUD, J. G. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **J. Exper. Biol.**, v.205, p.2885-2890, 2002.

- ISLAM, M. S.; AKHTER, T. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. **Advances in Life Sciences**, 2012.
- JAMIESON, B. G. M. Complex spermatozoon of the live-bearing half-beak, *Hemirhamphodon pogonognathus* (Bleeker): Ultrastructural description (Euteleostei, Atherinomorpha, Beloniformes). **Gamete Research**, 1989.
- JAMIESON, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)**. [s.l: s.n.].
- JAMIESON, Barrie GM; LEUNG, LK-P. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. **Cambridge University Press**, 1991.
- JONES, P. R.; BUTLER, R. D. Spermatozoon ultrastructure of *Platichthys flesus*. **Journal of Ultrastructure Research and Molecular Structure Research**, 1988.
- JORSTAD KE, NAEVDAL G. **Breeding and Genetics**. In: Pennel W, Barton BA, (Ed.). Principles of salmonid culture. Amsterdam: Elsevier, 1996. p.655-726.
- KALLMAN, K. D. The Platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In: **Handbook of Genetics**. [s.l: s.n.].
- KAVAMOTO, E. T., BARNABE, V. H., SANTO DE CAMPOS, B. D. E., & DE ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Medicina**, v. 25, p. 61–66, 1999.
- KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **B. Inst. Pesca**, v.13, n.1, p.95-100, 1986.
- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**. v. 42, p. 67-75, 1996.
- KIME, D. E., VAN LOOK, K. J. W., MCALLISTER, B. G., HUYSKENS, G., RURANGWA, E., & OLLEVIER, F. **Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish**. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology. **Anais...2001**
- KOWALSKI, R. K.; CEJKO, B. I. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. **Theriogenology**, 2019.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., & PATZNER, R. A.. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, 1998.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, 2010.
- LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. **Journal of Fish Biology**, 1998.
- LAHNSTEINER, Franz; PATZNER, Robert. Sperm morphology and ultrastructure in fish.

In: **Fish Spermatology** (eds.: SMH Alavi, J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee). Alpha Science International Ltd., 2008. p. 1-61.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resources**, 1996.

LEGENDRE, M. e BILLARD, R., 1980 Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. **Reproduction, Nutrition, and Development**, London, 20: 1859-1868.

LEITE, L. V., de OLIVEIRA, F. D. C. E., NUNES, L. T., NUNES, J. F., & SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. (2011). Criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, 6(2), 23-29.

LEITE, L. V., MELO, M. A. P., OLIVEIRA, F. C. E., PINHEIRO, J. P. S., CAMPELLO, C. C., NUNES, J. F., & SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2013.

LEUNG, L.K.P. & JAMIESON, B. G. M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge: University Press, 1991.

LE BAIL, P.Y., KEITH P. & PLANQUETTE, P. **Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 2, fascicule II)**. Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris: 307 p.2000.

LINHART, O., RODINA, M., FLAJSHANS, M., GELA, D.; KOCOUR, M. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, 2005.

LIU, Q., LI, J., ZHANG, S., DING, F., XU, X., XIAO, Z.; XU, S. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2006.

LIU, Y., YANG, H., TORRES, L., & TIERSCH, TR Ativação de espermatozoides livres e dissociação de feixes de espermatozoides (espermatozeugmata) de um peixe vivíparo em extinção, *Xenotoca eiseni*. **Bioquímica Comparada e Fisiologia Parte A: Fisiologia Molecular e Integrativa**, v. 218, p. 35-45, 2018.

LOIR, M., CAUTY, C., PLANQUETTE, P., & LE BAIL, P. Y Comparative study of the male reproductive tract in seven families of South-American catfishes. **Aquatic Living Resources**, 1989.

LOPES, J. T.; PINHEIRO, J. P. S.; NUNES, L. T.; PINHEIRO, R. R. R.; SOUZA, M. E. M.; ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, R. V.; CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 3, p. 170-175, 2014.

LUZ, R. K., FERREIRA, A. A., REYNALTE-TATAJE, D. A.; Zaniboni FILHO, E. Avaliação Qualitativa E Quantitativa do Sêmen de Suruvi, *Steindachneridion scripta* (PIMELODIDAE). **Fisheries (Bethesda)**, 2001.

MARIA, A. N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 2005. 71 p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade

Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARQUES, S. Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001

MAGGESE, M. C., CUKIER, M., CUSSAC, V. E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. **Rev. Brasl. Bio.**, v.44, n.4, p.541-546, 1984.

MAGNOTTI, C., CERQUEIRA, V., LEE-ESTEVEZ, M., FARIAS, J. G., VALDEBENITO, I.; FIGUEROA, E. **Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species** *Reviews in Aquaculture*, 2018a.

MAGNOTTI, C. C. F., Castro, J. D. J. P., Pedrotti, F. S., Sterzelecki, F. C., Sanches, E. G.; Cerqueira, V. R. Short-term storage of lebranche mullet mugil liza (Valenciennes, 1836) semen in natura and diluted with cf-hbss. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, 2018b.

MARTÍNEZ, J. G.; TARAZONA-MORALES, A. M.; PARDO-CARRASCO, S. C. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. **Animal Reproduction (AR)**, v. 9, n. 1, p. 19-26, 2018.

MATTHEWS, G. V. T. (1993). The Ramsar Convention on Wetlands: its history and development. Gland: Ramsar Convention Bureau.

MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. The spermatozoon of the African catfish: Fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 3, p. 545–560, 2002.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2004.

MATAVELI, M. et al. Avaliação da qualidade do sêmen de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **boletim do Instituto de Pesca**, 2007.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 12, p. 3038–3055, 1991.

MAZZOLDI, C.; LORENZI, V.; RASOTTO, M. B. Variation of male reproductive apparatus in relation to fertilization modalities in the catfish families Auchenipteridae and Callichthyidae (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Fish Biology**, 2007.

MCNIVEN, M. A.; GALLANT, R. K.; RICHARDSON, G. F. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. **Aquaculture**, 1993.

MEDEIROS CMO, FORELL F, OLIVEIRA ATD, RODRIGUES JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MEISNER, A. D., BURNS, J. R., WEITZMAN, S. H., & MALABARBA, L. R. Morphology and histology of the male reproductive system in two species of internally inseminating south american catfishes, *trachelyopterus lucenai* and *T. galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae). **Journal of Morphology**, 2000.

MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the

fish Brycon orthotaenia. **Animal Reproduction**, 2006.

MELO, R. M. C., ARANTES, F. P., SATO, Y., DOS SANTOS, J. E., RIZZO, E., & BAZZOLI, N.. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of Neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes). *Journal of Morphology*, 272, 525–535. 2011

MILIORINI, A. B., MURGAS, L. D. S., ROSA, P. V., OBERLENDER, G., PEREIRA, G. J. M.; DA COSTA, D. V.. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, 2011.

MIRANDA, Paula de Almeida Barbosa et al. Morfometria da Cabeça Espermática em Touros Nelore Submetidos a Deficiência de Zinco na Dieta. **Embrapa Gado de Corte**. Documentos, 2004.

MORAES, D. S. DE L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, 2002.

MORAES, G. F. Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*). 2004. 68f. 2003. Tese de Doutorado. **Dissertação** (Mestrado)- Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

MORISAWA, M., SUZUKI, K., SHIMIZU, H., MORISAWA, S.; YASUDA, K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 107, p. 95–103, 1983.

MORISAWA, S. Fine structure of micropylar region during late oogenesis in eggs of the hagfish *Eptatretus burgeri* (Agnatha). **Development Growth and Differentiation**, 1999

MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, 1980.

MUÑOZ, M., CASADEVALL, M., BONET, S., & QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Sperm storage structures in the ovary of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae): An ultrastructural study. **Environmental Biology of Fishes**, 2000.

SOLIS-MURGAS, L. D., FELIZARDO, V. O., FERREIRA, M. R., ANDRADE, E. S., & VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2011.

MEYER A, LYDEARD C. The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placenta and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes) inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene X-src. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci*. 1993;254:153–162.

MURGAS, L. D. S., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. (2004). Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2004.

MURGAS, L. D. S., MILIORINI, A. B., FREITAS, R. T. F. D.; PEREIRA, G. J. M.. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2007.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2003.

- MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.35, n.2, p.186-191, 2011.
- NASCIMENTO, A. F., MARIA, A. N., PESSOA, N. O., CARVALHO, M. A. M., & VIVEIROS, A. T. M. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, 118(2-4), 324-329. 2010
- NASCIMENTO, R. V., LEITE-CASTRO, L. V., MONTENEGRO, A. R., OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S., LOPES, J. T., DE ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1, p. 9, 2017.
- NAVARRO, Ó.; VELASCO SANTAMARÍA, Y.; CRUZ CASALLAS, P. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 2004.
- NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLAY, J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, London, v. 405, n. 6790, p. 1017-1024, 2000.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2006.
- OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007.
- ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, 2010.
- ORFÃO, L. H. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, 2011.
- PAABEN, U. et al. Sperm storage and fertilization in *Xiphophorus helleri*. **Proceedings of the C.E.B.A.S. Workshops**, 1996.
- PADUA, N. et al. Conservação do sêmen da carpa comum, *cyprinus carpio*, variedade ornamental, por resfriamento. **Acta Biomedica Brasiliensia**, 2012.
- PALHETA, M. J; Da SILVA, N. C. Pesca e territorialidades: contribuições para análise espacial da atividade pesqueira: 1 ed. Belém. Editora : GAPTA/UFPA, 2011
- PAIXÃO FILHO, J. M. Piscicultura no Maranhão em água doce: situação atual e perspectivas de crescimento futuro. **Dissertação (Mestrado em Economia)**. 2003. 91p. Universidade Federal de Pernambuco.PE. 2003
- PARREIRA, G. G. et al. Spermatozoon and its relationship with the ovarian lamellae in the internally inseminating catfish *Trachelyopterus galeatus*. **Microscopy Research and Technique**, 2009.
- PAUL LANG, R. et al. The Use of Dairy Protocols for Sperm Cryopreservation of Blue Catfish *Ictalurus furcatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2003.

- PAULINO, M. S. et al. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, 2011.
- PAVLOV, D. A.; RADZIKHOVSKAYA, Y. K. Reproduction biology of White Sea wolffish, *Anarhichas marisalbi*, based on experimental studies. **Journal of Ichthyology**, 1991.
- PAVLOV, D. A.; NOVIKOV, G. G. Life history and peculiarities of common wolffish (*Anarhichas lupus*) in the White Sea. **ICES Journal of Marine Science**, v. 50, n. 3, p. 271-277, 1993.
- PECIO, A., ; RAFIŃSKI, J. Structure of the Testes, Spermatozoa and Spermatozeugmata of *Mimagoniates barberi* Regan, 1907 (Teleostei: Characidae), an Internally Fertilizing, Oviparous Fish. **Acta Zoologica**. (1994).
- PEÑARANDA, D. S. et al. European eel sperm diluent for short-term storage. **Reproduction in Domestic Animals**, 2010.
- PEPPER VA, CRIM LW. **Broodstock Management**. In: Pennel W, Barton BA, (Ed.). Principles of salmonid culture. Amsterdam: Elsevier, 1996. p.231-290.
- PINHEIRO, J. P. S. et al. Qualidade do sêmen de tambaqui (*colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2016a.
- PINHEIRO, J. P. S. et al. Quality of tambaqui (*colossoma macropomum*) semen cryopreserved in different concentrations of egg yolk. **Ciencia Animal Brasileira**, 2016b.
- PINNA, M. C. C. **Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes** (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 278-330. 1998.
- POPHAM, P. L.; NOVACKY, A. Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. **Plant Physiology**, 1991.
- PRIETO MOJICA, C. Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei). **Aleph**, 2004.
- RANA, K. **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. [s.l.] Science, 1995.
- RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Testicular sperm cryopreservation of the teleost 'piau-açu' *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 75-79, 2003.
- ROUTRAY, P. et al. **Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation** **Fish Physiology and Biochemistry**, 2007.
- RURANGWA, E. et al. **The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish** **Aquaculture**, 2004.
- SALIBURY, G. .; VANDERMARK, N. .; LODGE, J. . **Fisiologia De La Reproduccion E Inseminacion Artificial De Los Bovidos**. Saragoça: Zaragoza: Acribia, 1978.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. et al. Cryopreservation extenders for fishes sperm of Characidae family. **Ciência Animal** , 2012.
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B., PINHEIRO, J. P. S., DE ALMEIDA, P. S., LOPES, J.

T., & LEITE, L. V. Methodologies for cryopreservation and mechanisms of sperm evaluation in characiformes fish. **Acta Veterinaria Brasilica**, 8(Suppl. 2), 343-350. (2014)

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B., LOPES, T. J., TORRES, M. T., PEREIRA, A. V., LEITE-CASTRO, V. L Conservação de gametas e embriões de peixes teleósteos. **R. bras. Reprod. Anim.**, v. 39, n. 1, p. 184-188, 2015.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigerated storage of lane snapper lutjanus synagris sperm. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 4, p. 293-305, 2010a.

SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, R.; SERRALHEIRO, P. C. S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, 2009.

SANTOS, G. M. **Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins**. Manaus: ELETRONORTE/CNPq/INPA. 1984

SANTOS, A. C. A. Ecologia alimentar do molé, *Trachelyopterus galeatus* Linnaeus, 1766 (Siluriformes, Auchenipteridae), em trechos inferiores dos rios Santo Antônio e São José (Chapada Diamantina, Bahia). *Sitentibus, Série Ciências Biológicas* 5:93-98. 2005.

SHALIUTINA, A. et al. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. **Animal Reproduction Science**, 2013.

SHIMODA E, ANDRADE DR, VIDAL JÚNIOR MV, GODINHO HP & YASUI GS (2007) Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócito de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 59:877-882.

SILVA, R. E. Perfil da piscicultura dos médios e grandes produtores do município de Matinha Maranhão. **Monografia (graduação em Agronomia)**. 30 p. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha- MA, 2016.

SILVA, F. C.; KUHNEN, V. V.; SANCHES, E. G. Refrigeração do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2018.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES Setorial, v.35, p.421-463, 2012.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K., VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin**, n. 9). p: 80. 1999.

SHUYANG, HE; WOODS, L. C. Changes in motility, ultrastructure, and fertilization capacity of striped bass *Morone saxatilis* spermatozoa following cryopreservation. **Aquaculture**, 2004

SOARES, A. T.; PESSOA, M. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tenol. & Ciencia Agropecuaria**, 2009.

SOARES, Maria Gercilia Mota; MENEZES, Naércio Aquino; JUNK, Wolfgang Johannes. Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. **Hydrobiologia**, v. 568, n. 1, p. 353-367, 2006.

- SOLIS-MURGAS, L. D. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186–191, 2011.
- SOUSA, D. G. et al. Estrutura Populacional e Reprodução do Anujá *Trachelyopterus galeatus*, (Linnaeus, 1766), em Uma Área de Uso Sustentável da Zona Costeira Amazônica. **Biota Amazônia**, 2016.
- SPADELLA, M. A.; OLIVEIRA, C.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Morphology and histology of male and female reproductive systems in the inseminating species *Scoloplax distolothrix* (Ostariophysi: Siluriformes: Scoloplacidae). **Journal of Morphology**, 2008.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. **Fish Physiology**, 1983a.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. **Fish Physiology**, v. 9, p. 305–350, 1983b.
- STREIT JR., D. P. et al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2004.
- STREIT JR., D. P. et al. MOTILITY, VIGOR AND pathologies in fresh AND CRYOPRESERVED SEMEN OF *Piaractus mesopotamicus*. **BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA**, 2009.
- SUQUET, M. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, 2000.
- TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, 1995.
- TANAKA, S. et al. Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. **Journal of Fish Biology**, 2002.
- TABORSKY, M. **Sperm competition in fish: “Bourgeois” males and parasitic spawning** *Trends in Ecology and Evolution*, 1998.
- TEIXEIRA, E.G.; **Caracterização e criopreservação de sêmen de tilápia-do-nilo cultivada no estado do Ceará**. Tese de Doutorado. Fortaleza (Ce): Universidade Federal do Ceará, 2013. 40 p. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil.
- TIERSCH, T. R. Cryopreservation in Aquarium Fishes. **Marine Biotechnology**, 2001.
- TIERSCH, T. R., WAYMAN, W. R., SKAPURA, D. P., NEIDIG, C. L., & GRIER, H. J. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Aquaculture Research**, 35(3), 278-288. 2004.
- TIERSCH, T. Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd edition. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, pp. 646–671. 2011.
- TOSHIO, I. et al. Activation of Respiration and Initiation of Motility in Rainbow Trout Spermatozoa : Physiology. **Zoological science**, 1988.
- UBILLA, A. et al. Short-term cold storage of the semen of rainbow trout *Oncorhynchus*

mykiss (Walbaum, 1792) incorporating DMSO in the sperm diluent. Effects on motility and fertilizing capacity. **Aquaculture Research**, 2015.

UBILLA, A.; VALDEBENITO, I. Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 2011.

VAJTA, G.; BOOTH, P. J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, v.18, p.191-195, 1997

VALDEBENITO, I. et al. Physical-chemical factors that regulate spermatid motility in fish: Basic and applied aspects. A review. **Archivos de Medicina Veterinaria**, 2009.

VALDEBENITO, I. I.; GALLEGOS, P. C.; EFFER, B. R. Gamete quality in fish: Evaluation parameters and determining factors. **Zygote**, 2015.

Vieira, M. J. A. F., Carvalho, M. A. M., Salmito-Vanderley, C. S. B., Salgueiro, C. D. M., Viveiros, A. T. M., Moura, A. A. A. N., & Nunes, J. F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de zootecnia**, 60(232), 1263-1270. 2011.

VIDAL, Maria F. Panorama da piscicultura no Nordeste. **Caderno Setorial ETENE**, v.1, n. 3, nov. 2016.

VILA, S. et al. Annual cycle of stored spermatozoa within the ovaries of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei, Scorpaenidae). **Journal of Fish Biology**, 2007.

VIVEIROS, A.T.M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology**, v.54, p.1395-1408, 2000.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): Effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, 2011.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2014.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. **Animal Reproduction Science**, 2016.

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.

VUTHIPHANDCHAI, V.; CHOMPETHAWACH, S.; NIMRAT, S. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. **Theriogenology**, 2009.

YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G. F; EMERSON , C. J. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, 2000.

YAO, Z.; CRIM, L. W. Spawning of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.): evidence in favour of internal fertilization of eggs. **Aquaculture**, 1995.

YAO, Z.; EMERSON, C. J .; CRIM, L.W. Ultrastructure of the spermatozoa and eggs of the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.)sperm after cryopreservation. **Aquaculture**. 181: 361 -375. 1995.

YAO, Z.; RICHARDSON, G. F.; CRIM, L. W. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture**, 1999.

YOSHIDA M, KAWANO N, YOSHIDA K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. **Cell Mol Life Sci** 2008;65:3446e57

WOURMS JP. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. **Am Zool**. 1977;17:379–410.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3. p.367- 373, 2007. [Links].