



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Amidas, sacarídeos e ATP exógeno na
criopreservação do esperma da espécie em perigo
de extinção piracanjuba, *Brycon orbignyanus*.**

Carolina Trindade Perry

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Rio Grande

2019



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Amidas, sacarídeos e ATP exógeno na criopreservação do esperma da espécie em perigo de extinção piracanjuba, *Brycon orbignyana*.

Aluno: Carolina Trindade Perry

Orientador: Antonio Sergio Varela Junior

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande

2019

*Dedico este trabalho a Vera Lúcia Trindade, ao meu filho Cassiano Perry Leal e ao meu
companheiro Carlos Augusto por ser o melhor da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande por possibilitar a realização do doutorado em período parcial.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais por todo conhecimento adquirido.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Sergio pela confiança e oportunidade de realizar a pesquisa em uma nova área.

A Dr^a Carine Corcini pela revisão crítica de todos os artigos aqui apresentados.

A Dr^a Fabiana Schneck pela colaboração com o artigo de cienciometria.

A toda equipe da Piscicultura Panamá, pela parceira desenvolvida ao longo destes anos, pelo acolhimento durante as coletas e pela confiança.

A toda equipe do RAC (Reprodução Animal Comparada) principalmente Andreia Anciuti, Marina Otte, Sara Soares, Izani Acosta, Stela Mari Gheller e Camila Carvalho Brito que foram essenciais nas coletas e análises.

A minhas colegas de trabalho Sabrina Amaral e Miriam Bicho pela cumplicidade, apoio e paciência.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro ao projeto.

A minha mãe por todo ajuda e apoia durante esta jornada, muitas vezes tomando conta das minhas obrigações da vida nos momentos em que mais precisa.

Ao meu companheiro pelo apoio e por ser um ótimo pai por cuidar tão bem do filho durante minhas varias ausências nas fases de coleta em Santa Catarina.

Muito obrigada a todos

RESUMO

A espécie *Brycon orbignyana* é uma espécie de água doce de ampla ocorrência no Brasil, que devido à construção de barragens, sobrepesca e deterioração do meio ambiente encontra-se ameaçada de extinção. A criopreservação é uma técnica de armazenamento ao longo prazo do material genético em baixas temperaturas e que pode ser usado principalmente em casos de perda de variabilidade genética das populações quando estas se encontram ameaçadas de extinção. O objetivo deste estudo foi testar novos crioprotetores para a criopreservação do esperma de *B. orbignyana* com o intuito de melhorar os protocolos já existentes. Foram testados crioprotetores penetrantes e crioprotetores não penetrantes para o congelamento em duas etapas distintas. Na primeira etapa usamos as amidas dimetilacetamida, dimetilformamida e metilformamida juntamente com o controle metilglicol (já em uso para esta espécie). Na segunda etapa testamos os açúcares rafinose, trealose, sacarose, lactose e o uso do ATP extracelular contra o controle (dimetilformamida 7,5%). As amostras descongeladas foram avaliadas por parâmetros de cinética espermática por *Computer Assisted Sêmen Analysis* (CASA) e os parâmetros de funcionalidade celular por citometria de fluxo. Também foi realizada uma análise cienciométrica dos artigos que publicados entre os anos de 1998-2017 sobre criopreservação visando à conservação da biodiversidade de peixes, a fim de verificar as tendências de publicações nesta área. Dentre as amidas testadas verificamos que a dimetilformamida na concentração de 7.5% mostrou melhores resultados em relação às outras amidas e ao controle atingindo uma motilidade de 66%. Dentre os açúcares testados a rafinose na concentração de 50 mM demonstrou ser mais eficaz em relação aos demais sacarídeos atingindo uma motilidade de 42%, apesar de não diferenciar do controle em relação à motilidade, apresentou menor taxa de fragmentação de DNA. Não foi observado nenhum benefício com o uso do ATP. Desta forma recomendamos a dimetilformamida sozinha ou combinada com a rafinose para a criopreservação do esperma de *B. orbignyana*. Também verificamos de acordo com o levantamento cienciométrico que a criopreservação ainda tem se focado principalmente em espécies que estão ameaçadas de extinção, mas que possuem algum interesse econômico.

Palavras-chave: criopreservação, *B. orbignyana*, amidas, sacarídeos, conservação, biodiversidade, peixes

ABSTRACT

The species *Brycon orbignyanus* is a species of fresh water of great occurrence in Brazil, due to the construction of dams, overfishing and deterioration of the environment it is threatened with extinction. Cryopreservation is a technique for the long-term storage of genetic material at low temperatures and can be used mainly in cases of loss of genetic variability of populations when they are threatened with extinction. The objective of this study was to test new cryoprotectants for the cryopreservation of *B. orbignyanus* sperm in order to improve the existing cryopreservation protocols. Penetrant cryoprotectants and non-penetrating cryoprotectants were tested for freezing in two distinct stages. In the first step we used the amides dimethylacetamide, dimethylformamide, metilformamide and methylglycol as control (already in use for this species). In the second step we tested the sugars: raffinose, trehalose, sucrose, lactose and the use of extracellular ATP against the control (dimethylformamide 7.5%). The thawed samples were evaluated for sperm kinetics parameters by Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and the cell functionality parameters by flow cytometry. A scientometric analysis of the articles published between 1998 and 2017 about cryopreservation for the conservation of fish biodiversity was also carried out, in order to verify the trends of publications in this area. Among the amides tested, it was found that the dimethylformamide at 7.5% presented better results than the other amides and the control reached 66% of motility. Among the sugars tested raffinose at 50 mM concentration showed to be more efficient in relation to the other saccharides reaching a motility of 42%, although not differentiating from the control in relation to motility, presented a lower rate of DNA fragmentation. No benefit was observed with the use of ATP. Thus we recommend dimethylformamide alone or in combination with raffinose for the cryopreservation of *B. orbignyanus* sperm. We also verified according to the scientometric survey focused mainly on species that are threatened with extinction, but which have some economic interest.

Key-words: cryopreservation, *B. orbignyanus*, amides, saccharides, conservation, biodiversity, fish

APRESENTAÇÃO

A tese é apresentada com uma introdução geral que busca uma revisão dos assuntos abordados em cada capítulo e segue conforme as regras da ABNT. Cada capítulo corresponde a um artigo que foi submetido ou será submetido para uma revista científica. As normas de todas as revistas foram anexadas no final de cada manuscrito e estão apresentadas de forma resumidas focando principalmente na preparação do manuscrito. As considerações e perspectivas finais visam uma conclusão envolvendo todos os capítulos da tese e também seguem as normas da ABNT. O primeiro capítulo trata sobre uma análise cienciométrica sobre as publicações que abordaram a criopreservação e a conservação das espécies de peixe e esta estruturada de acordo com a revista em que irá ser submetido “Brazilian Journal of Biology”. O segundo capítulo é o primeiro de uma série de três artigos sobre os crioprotetores que testamos na espécie em questão, trata do uso das amidas e esta na norma de acordo com a revista a qual foi submetido “Aquaculture”. O terceiro capítulo também sobre crioprotetores (açúcares), esta de acordo com as normas da revista “Aquaculture Internacional”. O último capítulo trata do uso de ATP exógeno e esta nas normas da revista “Cryoletters”.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
INTODUÇÃO GERAL.....	11
A espécie <i>Brycon orbignyanus</i>	12
A criopreservação e a conservação da biodiversidade de peixes.....	13
Crioprotetores, diluentes e crioinjúrias.....	17
Avaliação espermática pós-descongelamento.....	20
Referências bibliográficas.....	22
CAPÍTULO 1- A criopreservação e conservação da biodiversidade de peixes: uma análise cienciométrica.....	27
Introdução.....	28
Materiais e Métodos.....	29
Resultados.....	31
Discussão.....	33
Referências bibliográficas.....	37
Normas da revista.....	51
CAPÍTULO 2- Amides as cryoprotectants for the freezing of <i>Brycon orbignyanus</i> sperm ..	53
Introduction.....	54
Materials and methods.....	56
Results.....	59
Discussion.....	60
References.....	63
Normas da revista.....	72
CAPÍTULO 3- Rafinose, trehalose, sucrose, and lactose in the sperm cryopreservation of <i>Brycon orbignyamus</i>	75
Introduction.....	77
Materials and methods.....	79
Results.....	83
Discussion.....	84
References.....	87
Normas da revista.....	96
CAPÍTULO 4- Exogenous ATP in the cryopreservation of <i>Brycon orbignyanus</i>	100
Introduction.....	100
Materials and methods.....	100
Results.....	101
Discussion.....	102
References.....	102
Normas da revista.....	105
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FINAIS.....	109
ANEXOS.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (introdução)

Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes 1850)
.....11

Figura 2 (introdução)

“The Norwegian Gene Bank Program for Atlantic Salmon” (*Salmo salar*).
.....15

Figura 1 (capítulo 1)

Log de proporção de artigos ($\times 1000$) sobre a criopreservação relacionada à conservação da biodiversidade de peixes em relação ao número total de artigos publicados de 1998 a 2017 indexados pela Web of Science.
.....46

Figura 2 (capítulo 1)

Revistas que publicaram mais de dois artigos sobre criopreservação relacionados à conservação da biodiversidade de peixes indexados na Web of Science de 1998 a 2017 e variação temporal no fator de impacto padronizado.
.....47

Figura 3 (capítulo 1)

Número de artigos em relação ao número de citações recebidas e variação temporal no número padronizado.
.....48

Figura 4 (capítulo1)

Nacionalidade do primeiro autor e assuntos abordados nos artigos da pesquisa sobre o uso da criopreservação para a conservação da biodiversidade de peixes.
.....49

Figura 1 (capítulo 2)

Post thaw evaluation of spermatic kinetics: total and progressive motility, curvilinear, straight-line and average path velocities, curvilinear, straight-line and average path distances.
.....69

Figura 2 (capítulo2)

Post thaw evaluation of spermatic kinetics: straightness, linearity, wobble and beat cross frequency.
.....70

Figura 3 (capítulo 2)

Post thaw evaluation of sperm movement duration, mitochondrial functionality, cell integrity, plasma membrane integrity, membrane fluidity, concentration of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA fragmentation.
.....71

Figura 4 (capítulo 2)

Significant Pearson’s correlation ($P < 0.01$), between parameters of post-thaw quality of *B. orbignyanus* sperm.
.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (capítulo 1)

Referências das publicações que criopreservaram o esperma de espécies ameaçadas com a respectiva categoria de ameaça e indicação das espécies não encontradas na ASFI (2017).

.....50

Tabela 1 (capítulo 3)

Post thaw evaluation of spermatic kinetics: total motility, progressive motility, curvilinear, straight-line, average path velocities and linearity.

.....94

Tabela 2 (capítulo 3)

Post thaw evaluation of spermatic kinetics: curved line, straight line, average path distances, straightness, beat cross frequency and wobble.

.....94

Tabela 3 (capítulo 3)

Post thaw evaluation of flow cytometer. The effects on mitochondrial functionality, cell disruption, plasma membrane integrity, membrane fluidity, DNA fragmentation index, lipoperoxidation, concentration of reactive oxygen species.

.....95

Tabela 4 (capítulo 3)

Significant Pearson's correlation ($P < 0.01$), between parameters and concentration of saccharides.

.....95

Tabela 1 (capítulo 4)

Post thaw evaluation of sperm viability for all concentrations with *B. orbignyamus* sperm.

.....101

Tabela 2 (capítulo 4)

Significant Pearson's correlation ($P < 0.01$), between parameters and concentration of ATP.

.....101

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Brycon orbignyanus*

A espécie *Brycon orbignyanus* (Valenciennes 1850) é descrita taxonomicamente dentro de classe Pisces, subclasse Actinopterigii, superordem Ostariophysi, série Otophysi, ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae e gênero *Brycon* (LAUDER; LIEN, 1983). Conhecido como “piracanjuba, bracanjuba ou piracanjuba” (Figura 1) é uma espécie de cor laranja e apresenta uma cauda vermelha com uma faixa preta começando no pedúnculo caudal estendendo-se até os raios caudais medianos (GODOY, 1975; VAZ et al., 2000). Apresenta o corpo fusiforme e comprimido com a boca ampla e terminal, com três séries de dentes multicuspidados no pré-maxilar e duas no dentário (BRITTO et al., 2006; VAZ et al., 2000), possui exemplares registrados na natureza que atingem tamanho de até 79,5 cm e 6,0 Kg (GODOY, 1975). Assim como a maioria das espécies do gênero, apresenta hábito alimentar onívoro, com alterações ao longo do desenvolvimento ontogenético, com preferência por alimentos de origem animal e por zooplâncton nas fases larvais e por frutas e sementes na fase juvenil e adulta (VAZ et al., 2000; ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003).

Figura 1- Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes 1850).



Fonte: Oliveira et al., 2017

A piracanjuba está distribuída ao longo da bacia do Rio da Prata, composto pelos sistemas hidrográfico dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai cobrindo uma área de influência de cinco países como Brasil, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Argentina (REIS et al., 2003). Principalmente no Paraná e rios do Uruguai e seus afluentes (áreas da mata atlântica e de cerrado) e especialmente em regiões tropicais, há um amplo registro de ocorrências para a espécie *B. orbignyanus* (REIS et al., 2003).

É uma espécie que realiza grandes migrações reprodutivas durante os meses de novembro a fevereiro, período que coincide com os maiores índices pluviométricos, temperaturas elevadas e maior disponibilidade de alimento, permitindo maior sobrevivência das proles. A estratégia de migração entre os locais de alimentação e reprodução, além de estar relacionada com os processos fisiológicos da maturação final dos gametas, permite maximizar a utilização do ecossistema, pois assim busca os melhores locais para cada etapa de seu desenvolvimento (ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003).

As espécies migratórias como a piracanjuba são seriamente afetadas pelas hidrelétricas que causam mudanças e interferem em quase toda a fauna aquática, além da presença das barragens ela também é especialmente sensível às modificações ambientais como desmatamento ciliar, aumento da poluição e pela exploração comercial, uma vez que sua carne é de grande aceitação. A piracanjuba também é vítima da pesca esportiva, pois apresenta comportamento agressivo durante a pesca (AGOSTINHO et al., 2005). Todos estes fatos levaram a redução drástica das populações nativas remanescentes, fazendo com que a espécie se encontre ameaçada de extinção dentro da categoria em perigo (MMA, 2014).

O gênero Brycon, têm várias vantagens para a aquicultura, são de fácil adaptação ao cativeiro em quase todo o Brasil, aceitam facilmente alimentos de origem animal ou vegetal, crescem rápido, são bem comercializados e têm um grande potencial para cultivo em sistemas intensivos (ZANIBONI-FILHO et al., 2006). Contudo, apesar da atividade de aquicultura ter a sua importância econômica e ser considerada uma maneira eficiente de produzir alimentos, ainda tem uma base científica fraca em sua visão de conservação (AGOSTINHO et al., 2007). A maior parte do esforço de pesquisa despendido nesta área está focada no desenvolvimento de tecnologias e gestão das condições ambientais dentro dos tanques, enquanto pouco tem se investigado sobre a sustentabilidade das espécies no ambiente silvestre (AGOSTINHO et al., 2007).

Uma alternativa para a conservação destas espécies em conjunto com as práticas de aquicultura seria os programas de repovoamento (SIROL; BRITTO, 2006), no Brasil a piracanjuba é uma das espécies que está sendo testada neste tipo de programa (Lopera-Barrero et al., 2009). Entretanto sua aplicação é ainda limitada porque não há um guia para uso, o que resulta em estoques de peixe de baixa diversidade, podendo trazer danos às populações nativas (POVH et al., 2008). Apesar dos programas de repovoamento serem bem aceitos pela sociedade (SIROL; BRITTO, 2006) e parte da comunidade científica, é importante o monitoramento genético e biológico destas atividades, pois este reabastecimento pode representar um risco para as populações naturais e para o ecossistema (AGOSTINHO; GOMES, 2005). A necessidade de

incluir espécies no programa que visem à proteção da variabilidade genética de populações selvagens assim como a localização e períodos de liberação das progênes, tamanho corporal, mínimo dos indivíduos, quantidade e frequência das espécies em cativeiro que são liberados, são pontos importantes a serem considerados na gestão dos programas de repovoamento (SIROL; BRITTO, 2006). Existe uma necessidade de desenvolver o manejo genético das progênes para minimizar a perda de variabilidade genética da reprodução em cativeiro e também para respeitar a estrutura genética da população quando presente (LOPERA-BARRERO et al., 2009). A análise genética em estoques de incubatórios disponibiliza informações importantes para resultados significativos na conservação dos estoques pesqueiros, porque a perda de variabilidade genética é comum na piscicultura devido ao manejo inadequado de indivíduos reprodutores (POVH et al., 2008).

Neste contexto a técnica de criopreservação do esperma dos peixes é de grande valia, pois há a possibilidade de manter, manipular e gerenciar a variabilidade genética das espécies em cativeiro e criobancos (CABRITA et al., 2010; HORVÁTH et al., 2012). Isto é principalmente possível porque pode se realizar a análise de variabilidade genética dos materiais biológicos, enquanto uma parte é preservada para um uso em potencial como a reprodução artificial (FOPP-BAYATET et al., 2012).

A criopreservação e a conservação da biodiversidade de peixes

Durante as últimas décadas, a urbanização intensiva, o aumento populacional. As atividades de agricultura e industriais tem gerado enorme pressão nos ecossistemas aquáticos, diversos fatores como construção de barragens, sobrepesca, poluição e introdução de espécies exóticas tem sido responsáveis pela grande perda da biodiversidade da fauna de peixes (GREER; HARVEY, 2004). Esta questão tem gerado imensa preocupação tanto para governos como para pesquisadores devido aos riscos ecológicos associados e a ameaça à segurança alimentar em muitos países (PULLIN et al., 1998).

A preocupação com o meio ambiente tornou-se mais evidente na década de 70 com a Conferência Internacional sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento das Nações Unidas (UNCED) em Estocolmo em 1972, mas foi durante a década de 90 que ela também se focou nas espécies aquáticas, principalmente na fauna ictiológica. A evidência de uma perda drástica na diversidade genética aquática de modo algum significou um estabelecimento automático de um programa de banco de genes, assim como o que acontece na agricultura com os bancos de germoplasma (HARVEY et al., 1998). Com a crescente preocupação instituições como a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) realizaram convenções e

encontros para tratar da conservação dos recursos genéticos dos peixes, como a “FAO’S Expert Consultations” em Roma (1980, 1992) e o workshop da ICLARM-FAO também em Roma 1995 (HARVEY, 1998). Houve muitos debates sobre a contribuição adequada da conservação genética *ex situ* (aquela realizada fora do habitat natural da espécie) e em mais do que em alguns casos, houve evidência da preocupação imediata que a conservação *ex situ* fosse uma abdicação de uma responsabilidade maior, a proteção do habitat. Mas já em 1997, até mesmo a proteção do habitat não era garantia de recuperações da pesca (HARVEY, 1998).

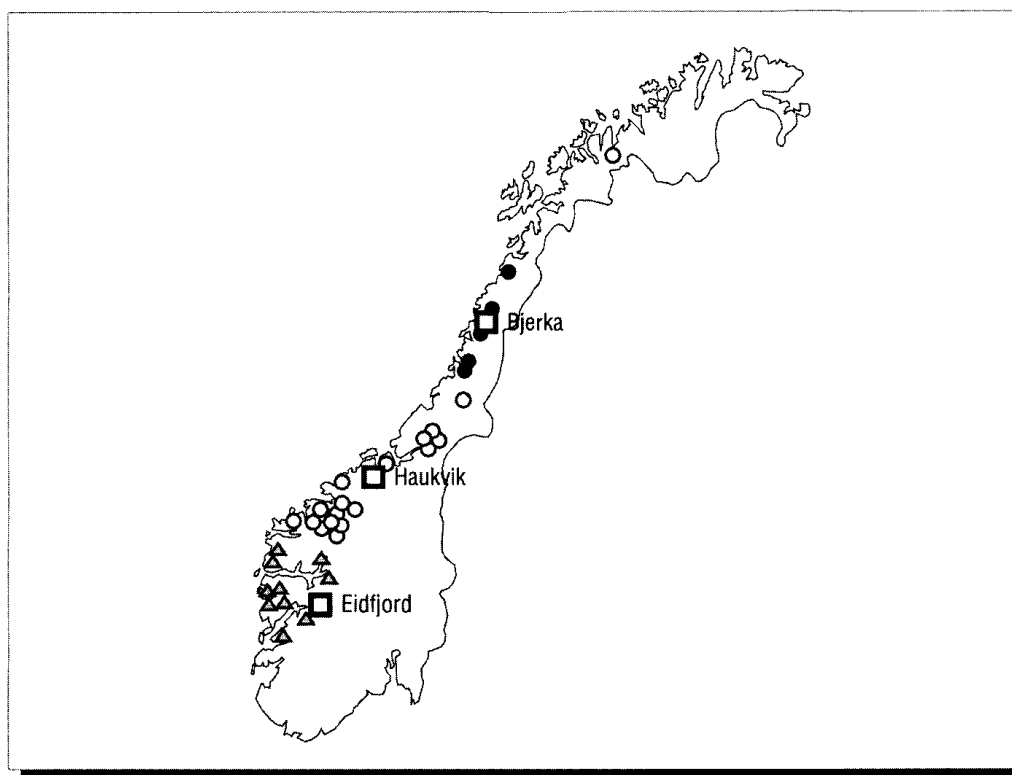
Desde então diversos países vem adotando bancos de germoplasma para espécies de peixes, como estratégia de conservação *ex situ*. De acordo com Roger Pullin (1998), bancos de germoplasma são qualquer coleção de material genético que mantenha a viabilidade futura para propósitos de estudos, conservação ou produção. No caso dos peixes bancos de germoplasmas podem ser os chamados bancos vivos, o qual constitui uma população em cativeiro com o propósito de manter a variabilidade genética dos organismos e os criobancos com material criopreservado que incluem o armazenamento de esperma, óvulos, embriões, células germinativas e de células somáticas.

Canadá (FORTIER, 1998), Finlândia (HEINIMA, 1998), Japão (WADA, 1998) e Noruega (WALSON, 1998) foram um dos primeiros a adotar os criobancos como ferramentas reconhecidas para a conservação dos recursos genéticos de peixes. Na Noruega houve uma grande preocupação com os estoques do salmão selvagens. As principais razões para o seu declínio populacional foram a precipitação ácida, o desenvolvimento hidrelétrico, o parasita do salmão, *Gyrodactylus salaris*, e a propagação do salmão que escapa das pisciculturas (WALSON, 1998). Características comuns na base genética foram encontradas em estoques de salmão norueguês e foram descritos como adaptações genéticas às condições ambientais locais. Cruzamento com fugitivos de cativeiros podem levar a uma mudança nessas adaptações. Por conseguinte, é importante proteger o material dos estoques individuais (WALSON, 1998). A criação do banco de genes norueguês inicialmente foi apenas de esperma congelado, o objetivo era preservar material genético de mais de 100 unidades populacionais e de pelo menos 50 indivíduos de cada estoque (Figura 2). Para que isso fosse possível se adotaram as seguintes estratégias de amostragem: pelo menos 50 indivíduos de cada estoque foram congelados; cada rio é considerado uma unidade de amostragem; grandes afluentes são amostrados separadamente; a amostragem é realizada por um período de pelo menos três anos em cada rio para reduzir chances de super-representação bruta de uma única classe de ano; é dada ênfase à amostragem de unidades populacionais representando uma ampla faixa ecológica; os estoques ameaçados de extinção

recebem prioridade sobre os demais estoques; os estoques de valor científico específico ou valiosos para fins de pesca são também prioridade (WALSON, 1998).

Com o passar do tempo, após os primeiros países adotarem os criobancos, a criopreservação tem ganhado espaço nos programas de conservação das espécies. Mas a efetividade depende muito mais do que o armazenamento do esperma de espécies ameaçadas. Os criobancos quando estão associados aos bancos vivos garantem de forma mais efetiva a conservação, de modo que se possa facilitar o manejo genético da população em cativeiro (GREER; HARVEY 2004). Inclusive também, como forma de seguro para espécies em perigo crítico de extinção, pois mesmo sendo possível preservar apenas a parte paterna do genoma, caso haja uma boa representação de machos num criobanco é possível que a variabilidade genética de um determinado estoque seja bem representada e se houver fêmeas disponíveis nos bancos vivos a conservação é mais bem assegurada (HARVEY, 1999).

Figura 2 - “The Norwegian Gene Bank Program for Atlantic Salmon” (*Salmo salar*). Os três centros bancários de genes (quadrados) preservam 33 unidades populacionais: 5 em Bjerka (círculos fechados), 18 em Haukvik (círculos abertos) e 10 em Eidfjord (triângulos), Noruega.



Fonte: Walso, 1998 em Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada.

Ambos os tipos de bancos de genes – bancos vivos e criobancos - envolvem a pesca, porque a questão do banco de genes é coletar material genético selvagem, os coletores devem ser capazes de ir aos rios, lagos ou no oceano com os devidos meios de encontrar e capturar peixes

selvagens e vivos. Porém existem algumas complicações. Os doadores de esperma precisam estar maduros, o que ocorre em certas épocas do ano, eles tendem a frequentar certos locais quando estão prontos para desovar, além disso, podem viajar em grupos de desova que não devem ser perturbados pela remoção de alguns peixes (GREER; HARVEY, 2004).

Assim, a engrenagem necessária inclui ferramentas de pesca típicas tais como barcos, motores, redes e roupas impermeáveis para rios, bem como tanques criogênicos se o esperma for congelado. Se os reprodutores forem procurados, eles precisam ser pescados e manuseados com cuidado e transportados para a instalação de espera (banco vivo) com mortalidade mínima possível, já que há situações de estresse. O transporte é geralmente por caminhão e deve ser limitado a menos de um dia para garantir uma boa sobrevivência. Se os espermatozoides forem congelados, os peixes machos devem ser classificados manualmente para saber se estão maduros, assim será possível obter os espermatozoides dos doadores selecionados por massagem abdominal, ambos os procedimentos envolvem habilidade e conhecimento local (GREER; HARVEY, 2004). O processo de congelamento é simples e envolve misturar os espermatozoides com uma mistura crioprotetora para armazená-los em um recipiente criogênico. A remoção dos espermatozoides não prejudica os peixes doadores, que muitas vezes são devolvidos para desova natural na natureza. Os reprodutores vivos que forem coletados para formar um banco genético vivo são geralmente acondicionados em tanques, com controles de escape para garantir que eles e sua progênie não fujam, seja para recintos vizinhos ou para o mundo exterior (GREER; HARVEY, 2004). O software para manter o controle das amostras criopreservadas de peixes não é nem de perto tão desenvolvida quanto o software de banco de genes para plantas, mas a maioria das coleções são relativamente pequenas (menos de 2500 amostras) e podem ser gerenciadas usando planilhas (GREER; HARVEY, 2004).

Os bancos de genes vivos são extremamente importantes, no entanto, eles são caros para manter a menos que estejam associados a empresas comerciais viáveis como as apoiadas por indústria da aquicultura (PULLIN, 1998). Em 2014 cerca de 93 milhões de toneladas de peixes foram retirados diretamente dos mares naturais e dos rios, enquanto apenas 73 milhões de toneladas vieram da aquicultura FAO (2016). Uma forma indireta de contribuição dos criobancos para a diminuição da pressão sobre os estoques naturais seria um maior investimento na aquicultura sustentável. A introdução ou a expansão da aquicultura de peixes cria a necessidade dos fabricantes considerarem uma ampla variedade de questões, como os impactos ambientais, riscos potenciais para a saúde dos consumidores de produtos geneticamente modificados, acesso dos piscicultores aos reprodutores selvagens e a transferências de seus ecossistemas de origem. Pesquisas sobre as diferentes características genéticas de diferentes populações selvagens e

conservação da diversidade genética selvagem são indispensáveis para a manutenção dos estoques. É necessário desenvolver novas abordagens políticas para novos usos da biodiversidade aquática (GREER; HARVEY, 2004).

Seja qual for a abordagem adotada para a melhoria dos estoques cultivados, os aquicultores precisam pronto acesso a recursos genéticos. Fontes potenciais incluem:

- estoques selvagens em seu habitat natural.
- coleções de reprodutores ("bancos vivos") em fazendas ou em institutos de pesquisa.
- pisciculturas rurais em países em desenvolvimento.
- bancos de genes criopreservados (espermatozoides congelados ou embriões) (GREER; HARVEY, 2004).

No Brasil ainda de forma incipiente na formação de criobancos temos algum esforço da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), a qual realizou a elaboração de manual de curadores para manter criobancos com o esperma de peixes. No manual é possível encontrar recomendações para o congelamento de algumas espécies brasileiras que já foram testadas para a criopreservação. Também é ressaltada a necessidade de descritores dos criobancos serem documentados em planilhas eletrônicas e em bancos de dados informatizados. Estes descritores são principalmente, concentração espermática, local de coleta e inclusive a identificação do doador por meio de análise molecular (CARNEIRO et al., 2012). A Companhia Energetica de São Paulo (CESP) também possui um programa de conservação de espécies ameaçadas em que se utiliza de criobancos para a reprodução artificial, principalmente de espécies ameaçadas como *Steindachneridion scriptum* e *Brycon orbignyianus* (CESP, 2006).

Todo esforço envolvido no processo de conservação das espécies de peixe via criopreservação será mais bem recompensado se a qualidade e viabilidade do criobanco forem a melhor possível, garantido maiores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. Por isso é imprescindível a pesquisa que envolve a melhora de crioprotetores, diluentes e protocolos de congelamento usados para a criopreservação, visto que a interação com os crioprotetores é específica da espécie, uma vez que a composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente devido às diferentes concentrações de lipídios, açúcares e ácidos encontradas para as diferentes espécies existentes (HOLT, 2000).

Crioprotetores, diluentes e crioinjúrias

A criopreservação é um processo em que materiais biológicos, como células e tecidos são preservados por resfriamento a temperaturas muito baixas, geralmente a -196 ° C (temperatura do

nitrogênio líquido), mas permanece viável após um aquecimento posterior em temperaturas acima de 0 °C. Ela possibilita o armazenamento quase indefinido dos pools de genes desejáveis e assegura a disponibilidade de sêmen criopreservado para inseminação artificial e reprodução (MEDEIROS et al., 2002). Quando se trata das espécies de peixes a criopreservação das células espermáticas é a única vantajosa para a reprodução das espécies, visto que a viabilidade de embriões e óvulos de peixes criopreservados ainda não foi alcançada. O congelamento de sêmen é uma técnica vantajosa, pois facilita reprodução artificial, elimina a assincronia gonadal entre machos e fêmeas, aumenta a produção larval e permite a construção de bancos de germoplasma (CABRITA et al., 2010). Globalmente, o método de criopreservação inclui redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento. A redução da temperatura normal para 4 °C reduz a atividade metabólica celular e aumenta o tempo de vida das células espermáticas. A criopreservação interrompe a atividade celular, reiniciando suas funções normais após o descongelamento (MEDEIROS et al., 2002).

Para ser possível preservar as células em baixas temperaturas é necessário o uso de crioprotetores e diluentes. Independentemente da espécie, o esperma do peixe requer diluição antes do congelamento para melhor sobrevivência. Os diluentes são soluções de sais balanceados que tem função de carrear os crioprotetores para dentro das células e no caso dos peixes, também de inibir a ativação do esperma, por isso devem ser adaptados para manter os espermatozoides completamente quiescentes. Para isso os diluidores devem ter pH, capacidade de tamponamento e osmolalidade adequada e devem proteger as células espermáticas das lesões criogênicas (AKCAY et al., 1995).

Um diluente ideal é isotônico, possui uma boa capacidade de tamponamento, contém nutrientes, estabilizante, antioxidantes e agentes antibacterianos. Os diferentes sais, compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos diluidores são usados para simular o meio externo de uma espécie, como exemplo o NaHCO₃, KHCO₃ e o TRIS são usados como tampão, o NaCl usado para tonicidade e o KCl para impedir a ativação do esperma, íons como o Mg²⁺ e o Ca²⁺ são componentes normais do fluido seminal e os açúcares são fonte de energia (MUCHLISIN, 2005). Inúmeras soluções foram testadas para espermatozoides de peixe; algumas eram soluções salinas simples (0,8 ou 0,9% NaCl) ou açúcar (5% glicose), enquanto outras possuem fórmulas mais complexas, como BTSTM e o MinitubTM onde sais e glicose são combinados (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

A definição de um crioprotetor é qualquer soluto que, quando adicionado às células em seu meio, permite maiores recuperações pós-descongelamento do que se não estivesse presente (KAROW; ARMAND, 1969). Os crioprotetores são de duas categorias: crioprotetores penetrantes e crioprotetores não penetrantes. Os crioprotetores permeáveis à membrana celular são chamados de penetrantes, possuem baixo peso molecular e o seu efeito crioprotetor é atribuído à sua propriedade

coligativa ou de ligação com a água reduzindo a temperatura de congelamento do meio intracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo, diluindo as altas concentrações de sais e diminuindo a pressão osmótica do meio resfriado (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Dos agentes crioprotetores penetrantes temos as classes dos álcoois e derivados do metanol como etileno glicol, glicerol, metilglicol; os derivados dos sulfóxidos e amidas como o dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metilformamida e as aminas como prolina e glutamina (ELLIOT et al., 2017). Já os crioprotetores não penetrantes possuem alto peso molecular e não são permeáveis à membrana celular. Portanto, podem alterar a membrana plasmática ou agir como um soluto, diminuindo a temperatura de congelamento do meio e diminuindo a formação de gelo extracelular (MUCHLISIN, 2005). Das classes dos crioprotetores não penetrantes temos os açúcares: galactose, lactose, sacarose; os polímeros como amido hidroxietílico e as proteínas séricas e proteínas do leite (ELLIOT et al., 2017). A adequação de diluentes e crioprotetores diferem de um peixe para outro, os constituintes químicos dos diluentes variam enormemente e temos também uma variedade de agentes crioprotetores de categorias penetrantes e não penetrantes que estão disponíveis para minimizar as lesões criogênicas durante o processo de resfriamento e descongelamento (MUCHLISIN, 2005).

Apesar da eficácia dos crioprotetores e diluentes na viabilidade espermática pós-descongelamento, os protocolos de criopreservação causam vários danos nas células espermáticas, o chamado criodano ou lesões criogênicas, os espermatozoides são expostos a estresse físico e químico e mudanças na composição lipídica da membrana plasmática, podendo causar danos estruturais e modificações funcionais nos espermatozoides. Danos na viabilidade, motilidade, velocidade e potencial de fertilização dos espermatozoides são parcialmente devidos a distúrbios da integridade da membrana plasmática e a outros fatores ainda não definidos (ELLIOT et al., 2017). Acredita-se que a maioria desses efeitos deletérios esteja relacionada às espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante a criopreservação, as quais são também um dos efeitos mais estudados e potencialmente causador de criodanos (BUCAK et al., 2013; LUCIO et al., 2016).

Durante o congelamento o metabolismo dos espermatozoides é desacelerado, onde permanece ativo e reduzido, contudo, o choque térmico e a exposição ao oxigênio atmosférico tornam as células suscetíveis a formação de EROS (KARAJI et al., 2014). A produção de EROS como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânions superóxido (O₂⁻) e radicais hidroxila (OH⁻) aumenta nas mitocôndrias espermáticas devido ao congelamento e ao descongelamento, enquanto um mecanismo osmótico pode aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial, ativando assim a apoptose. De fato, o estresse oxidativo é um indutor de apoptose bem documentado (AMIDI et al., 2006). Estes efeitos podem induzir danos estruturais às mitocôndrias que

desempenham um papel fundamental no mecanismo de ativação do movimento flagelar durante a motilidade espermática, assim os criodanos alteram os processos bioquímicos envolvido na produção de ATP, causando uma redução na motilidade dos espermatozoides.

Danos por fragmentação do DNA nuclear e diminuição da motilidade espermática estão principalmente associados a danos na estrutura e no funcionamento metabólico da mitocôndria (FIGUEROA et al., 2017). As altas concentrações de EROs além de causarem a ruptura das membranas mitocondrial e plasmática, também agem na fragmentação cromossômica e do DNA levando a uma redução na motilidade e viabilidade espermáticas (TAYLOR et al., 2009). Uma porcentagem elevada de DNA fragmentado causa falha no desenvolvimento do embrião, além disso, o DNA de boa qualidade é essencial para a consequente manutenção de futuras gerações saudáveis (EVENSON, 1999).

Nas membranas celulares o efeito dos EROS causa a peroxidação lipídica, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, o que as torna suscetíveis aos danos induzidos por oxigênio (SIKKA, 2001), além da deficiência inata dos espermatozoides quanto à disponibilidade de enzimas protetoras citoplasmáticas tornando estas células ainda mais sensíveis (LENZI et al., 1996). A peroxidação de lipídios da membrana plasmática (LPO) tem sido proposta como um dos principais fatores envolvidos no criodano de espermatozoides em muitas espécies (PAGL et al., 2006).

Além dos possíveis ataques das moléculas de EROS durante o congelamento e descongelamento, a redução da fertilidade do sêmen congelado é atribuída em grande parte à alteração da estrutura e função da membrana durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. A natureza do dano da membrana a uma redução de temperatura permanece incerta, mas evidências sugerem que as membranas estão também comprometidas devido à reordenação dos lipídios durante o resfriamento e o aquecimento, perturbando assim as associações entre lipídios e proteínas lipídicas necessárias para a função normal da membrana (PARKS et al., 1992). De certa forma a membrana altera seu mecanismo de empacotamento lipídico, o qual modifica a sua estrutura com espaçamento entre os lipídeos, aumentando a fluidez de membrana e contribuindo para o rompimento celular. Todos esses fatores levam ao potencial iminente de crioinjúria, incluindo por choque frio, dano por congelamento ou descongelamento (TORRES et al., 2016).

Avaliação espermática pós-descongelamento

O controle da qualidade dos espermatozoides é uma questão importante tanto para a indústria da aquicultura como para a conservação das espécies, no entanto, tem sido

extremamente difícil estimar com precisão a qualidade dos espermatozoides e correlacionar esses estimadores de qualidade com a capacidade dessas células, não apenas para alcançar o oócito e fertilizar o óvulo, mas também para contribuir com desenvolvimento embrionário precoce bem sucedido. Essa avaliação da qualidade pode ser relevante para entender melhor os mecanismos pelos quais o esperma é afetado e para controlar alguns dos fatores que influenciam a qualidade geral dos gametas (CABRITA et al., 2014). O espermatozoide pós-descongelamento é avaliado principalmente pela porcentagem de motilidade observada em um microscópio de luz. Este método de avaliação é subjetivo e usa a estimativa visual de parâmetros, mas durante as últimas décadas, o uso da análise de esperma assistida por computador (Computer Assisted Sperm Analysis, C.A.S.A.) tem se tornado a principal forma de avaliação da cinética espermática (VIVEIROS; GODINHO, 2009). O CASA é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (VERSTEGEN et al., 2002). A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo que a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis é o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (VERSTEGEN et al., 2002).

Mesmo com a significativa contribuição do CASA para a análise de viabilidade espermática, é amplamente reconhecido que apenas esta técnica não é suficiente para descrever completamente o conjunto de propriedades biológicas espermáticas necessárias para alcançar a fertilização (CORDELLI et al., 2005). Mais recentemente, o uso de corantes fluorescentes, tornou-se mais popular nos laboratórios. Sondas como Hoechst, PI/SYBR-14, DAPI, eosine, trypan blue, YO-PRO1 são usadas para analisar a membrana plasmática, por exemplo, e outras como JC1, Rhodamine 123 são usadas para avaliação de mitocôndria e para determinar a fragmentação de DNA é possível realizar os ensaios de TUNEL ou “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA) (CABRITA et al., 2014). Esses biomarcadores representam uma nova classe de indicadores objetivos, sensíveis e viáveis da função reprodutiva masculina. Neste contexto, a citometria de fluxo automatizada, que pode medir simultaneamente importantes e múltiplos atributos espermáticos, incluindo viabilidade celular, conteúdo e estrutura de DNA, integridade acrossomal e função mitocondrial, é um método valioso para avaliar a qualidade das células espermáticas. A citometria é uma abordagem automatizada capaz de medir quantidade de uma ou mais manchas fluorescentes associadas às células,

oferecendo propriedades incomparáveis de precisão, sensibilidade, precisão, rapidez em um número estatisticamente relevante de células (CORDELLI et al., 2005).

Apesar da longa data deste que foi utilizado o primeiro crioprotetor para o uso em espermatozoides de peixe por Blaxter (1953), a pesquisa em criopreservação para espécies de peixes continua buscando novos protocolos de congelamento, novos crioprotetores e diluentes mais apropriadas para determinadas espécies assim como novas formas de avaliação que visam melhor refletir a verdadeira eficácia dos métodos de congelamento.

Como justificativa para a realização do trabalho de tese temos a importância de garantir a melhor viabilidade espermática possível para a criopreservação do espermatozoides de *Brycon orbignyanus*, espécie em perigo de extinção, com grande potencial para aquicultura e programas de conservação de espécies.

Nosso principal objetivo é fornecer um protocolo de criopreservação que garanta a viabilidade das células espermáticas. Como objetivos específicos têm: analisar o resultado da utilização de diferentes concentrações das amidas: MF, DMF e DMA associadas ao diluente BTS™ sobre a estrutura (membrana, mitocôndria e DNA), danos (peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio) e cinética espermática; analisar o resultado da combinação da melhor amida junto com sacarídeos (rafinose, trealose, sacarose e lactose) associado ao diluente BTS™ sobre a estrutura, danos e cinética. Analisar a possível eficácia do ATPe em diferentes concentrações associado ao diluente BTS™ sobre a estrutura, danos e cinética. Determinar qual das concentrações dos crioprotetores combinados ou não preservou melhor a viabilidade espermática. Por último fornecer uma visão geral do papel da criopreservação na conservação de espécies ameaçadas.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A. GOMES, L. C. **O manejo da pesca em Reservatórios da bacia do Alto Rio Paraná: Avaliação e Perspectivas.** In: NOGUEIRA, M. G. HENRY, R. JORCIN, A. Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. 1 ed. São Carlos: Rima, 2005 p.23-55.

AGOSTINHO, A. A. GOMES, L.C. PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil.** Maringá: EDUEM, 2007.

AKCAY, E. TEKIN, N. SECER, S. Preservation of fish semen. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 12, p. 367-373, 1995.

- AMIDI, F. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and tissue banking**, v. 17, n. 4, p. 745-756, 2016.
- BLAXTER, J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, v. 172, n. 4391, p. 1189, 1953.
- BRITTO, S. G. C. et al. **Peixes do Rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2006.
- BUCAK, M. N. et al. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 34-39, 2013.
- CABRITA, E. et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, n. 5, p. 623-635, 2010.
- CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389-401, 2014.
- CARNEIRO, P. et al. **Manual de curadores de germoplasma-animal: conservação ex situ/in vitro de sêmen de peixes**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (INFOTECA-E), 2012.
- CORDELLI, E. et al. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception**, v. 72, n. 4, p. 273-279, 2005.
- ELLIOTT, G. D. WANG, S. FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74-91, 2017.
- EVENSON, D. P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 1999.
- FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome, 2016, 200p.
- FIGUEROA, E. et al. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 1, p. 76-87, 2017.
- FOPP-BAYAT, D. CIERESZKO, A. Microsatellite genotyping of cryopreserved spermatozoa for the improvement of whitefish semen cryobanking. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 196-201, 2012.
- FORTIER, F. **The Cost of Pacific Salmon Conservation: A Shuswap Perspective on Fisheries Conservation and Local and Indigenous Communities** In: HARVEY et al. (eds). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p. 87-90.
- GODOY, Manuel Pereira. **Peixes do Brasil**, subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu- Piracicaba. Franciscana, 1975, p.1-4.

GREER, D. HARVEY, B. **Blue genes: sharing and conserving the world's aquatic biodiversity**. Londres: Earthscan, 2004.

HARVEY, B. **An Overview of Action Before Extinction**. In: HARVEY et al. (eds). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p. 1-20.

HARVEY, B. **Fish genetic conservation in Canada and Brazil: field programs and policy development**. In: PULLIN, R. S. V. BARTLEY, D. M. KOOIMAN, J. (eds). Towards policies for conservation and sustainable use of aquatic genetic resources. Bellagio, Italy, Abr.14-18. ICLARM Conf. Proceeds, Rome, 1999. p. 17-22.

HEINIMAA, P. **Preservation Programs for Endangered Fish Stocks in Finland**. In: HARVEY, B. et al. (eds). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p. 150-114.

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

HORVÁTH, Á. et al. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). **Aquaculture**, v. 358, p. 213-215, 2012.

KARAJI, R. O. KIA, H. D. ASHRAFI, I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. **Cell and tissue banking**, v. 15, n. 3, p. 461-470, 2014.

KAROW JR, ARMAND M. Cryoprotectants a new class of drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 21, n. 4, p. 209-223, 1969.

LAUDER, G. V. LIEM, K. F. The evolution and interrelationships of the Actinopterygian fishes. **Bulletin of The Museum of Comparative Zoology**, v. 150, p. 95-197, 1983.

LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human reproduction update**, v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciência e Investigación Agrária**, v. 36, n. 2, p. 191-208, 2009.

LUCIO, C. F. et al. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568-1575, 2016.

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

MMA, 2014. **Lista Oficial das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção e Sobre explorados ou Ameaçados de Sobre-exploração**. Disponível em:

http://scientific.thomsonreuters.com/imgblast/JCR_FullCovlist_-2016.pdf. Acesso em: 1 dec. 2016.

MUCHLISIN, Z. A. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 6, n. 1, 2005.

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

PAGL, R. et al. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 C. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1115-1122, 2006.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

POVH, Jayme A. et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e investigación agraria**, v. 35, n. 1, p. 5-15, 2008.

PULLIN, R. S. **Gene Banking for Fish and Other Aquatic Organisms: ICLARM's Perspectives and Experiences**. In: HARVEY et al., (ed). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p. 31-43.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. FERRARIS, J. C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003 742p.

REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 851-862, 2001.

SIROL, R. N. BRITTO, S. G. **Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RIMA, p. 275-284, 2006.

TAYLOR, K. et al. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive Biomedicine online**, v. 18, n. 2, p. 184-189, 2009.

TORRES, L. TIERSCH, T. R. Amine reactive dyes: an alternative to estimate membrane integrity in fish sperm cells. **Aquaculture**, v. 463, p. 71-78, 2016.

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

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

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

WADA, K.T. **The Present Status of Genetic Conservation of Cultured Aquatic Species in Japan**. In: HARVEY et al., (ed). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p.225-232.

WALSO, O. **The Norwegian Gene Bank Program for Atlantic Salmon (*Salmo salar*)** - In: HARVEY et al., (ed). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p. 97-104.

ZANIBONI-FILHO, E. SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguay River. Migratory fishes of South America: **Biology, fisheries and conservation status**, p. 157-194, 2003.

ZANIBONI FILHO, E. TATAJE, D. R. WEINGARTNER, M. Potencialidad del género Brycon en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 19, n. 2, p. 233-240, 2006.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido para a revista “*Brazilian Journal of Biology.*”

A criopreservação e conservação da biodiversidade de peixes: uma análise cienciométrica

Carolina Trindade Perry¹, Carine Dahl Corcini², Antonio Sergio Varela-Junior^{1,2}

1 Universidade Federal do Rio Grande, Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais. Rio Grande, 9620-900, Brasil.

2 Universidade Federal de Pelotas, Medicina Veterinária. Capão do Leão, 96010900, Brasil.

Resumo

O presente estudo é uma análise cienciométrica das publicações que relacionam a criopreservação à conservação da biodiversidade de peixes. Nossos principais objetivos são: ter uma visão geral das tendências e lacunas na pesquisa envolvendo criopreservação focada na conservação de espécies; verificar quais são as diferentes pesquisas dentro da criopreservação que mais contribuem para a conservação da biodiversidade de peixes e conhecer as espécies mais estudadas para criopreservação de espermatozoides para fins de conservação. Utilizamos palavras-chave para selecionar publicações no banco de dados da Web of Science (Thomson Reuters) entre 1998 e 2017 relacionadas à criopreservação na conservação da biodiversidade de peixes. Foram encontrados 90 artigos publicados em 46 periódicos, a análise cienciométrica revelou uma tendência de diminuição da qualidade e um aumento no número de publicações entre o período de 2007 e 2010 com uma diminuição após este período. A ordem com o maior número de pesquisas relacionadas são os Characiformes seguido dos Cypriniformes. O gênero *Brycon* é o mais frequente e a espécie brasileira *Brycon orbignyanus* é a mais estudada. De acordo com a pesquisa, a criopreservação tem se concentrado principalmente em espécies ameaçadas, mas ao mesmo tempo elas têm importância na pesca ou aquicultura, países com maior diversidade aquática apresentam maior número de publicações, destacando também a participação de países em desenvolvimento. O congelamento de espermatozoides foi o tipo de pesquisa mais frequente, mas também houve uma participação significativa de pesquisas que tentam preservar os genomas materno e paterno, como a técnica de transplante de células germinativas. Por fim, houve menor

participação no número de publicações que tratam de programas de conservação que utilizam a criopreservação como ferramenta. Como principal lacuna, observou-se a falta de pesquisas que realizam estudos de variabilidade genética utilizando criopreservação para a conservação da biodiversidade de peixes.

Palavras chaves: cienciometria; criopreservação; peixes; biodiversidade

Introdução

A criopreservação é uma técnica de armazenamento em longo prazo a baixas temperaturas, preservando células e tecidos vivos, bem como material genético. No caso do congelamento de espermatozoides é possível armazenar um pool genético por tempo indefinido para um uso potencial, como inseminação artificial e reprodução (Tsai et al., 2012). A primeira pesquisa sobre criopreservação de esperma de peixe foi publicada por Blaxter (1953), desde então novas pesquisas surgiram para demonstrar a viabilidade da criopreservação de peixes em um grande número de espécies de água doce e marinhas (Cabrita et al., 2010). A criopreservação de esperma de peixe é uma técnica de indiscutível interesse que pode ser aplicada em diversos campos de pesquisa e produção, mas sua maior aplicação é certamente na aquicultura comercial (Cabrita et al., 2010). Em seu uso na conservação da biodiversidade de peixes, tem sido uma alternativa para a preservação da variabilidade genética adotada por muitos países através da criação de bancos de germoplasma (Harvey et al., 1999; Greer and Harvey, 2004). Segundo Pullin (1998), bancos de germoplasma são qualquer coleção de material genético que mantém viabilidade futura para fins de estudos, conservação ou produção. Bancos de germoplasma com material criopreservado ou criobancos incluem o armazenamento de espermatozoides, óvulos, embriões, células germinativas e células somáticas (Tsai et al., 2012).

Os espermatozoides são a maioria em estudos de criopreservação devido à estrutura celular simples, tamanho pequeno e alta resistência à refrigeração (Cabrita et al., 2010). Assim, quando se trata da conservação da ictiofauna ameaçada, os criobancos de espermatozoides têm maior relevância, uma vez que a criopreservação de óvulos e embriões ainda não apresenta

resultados satisfatórios quanto à viabilidade celular (Tsai et al., 2012). Uma das principais contribuições dos bancos de esperma é a preservação da variabilidade genética, a redução da endogamia em bancos vivos (organismos criados em cativeiro) e a preservação de material genético por longos períodos como medida de segurança contra futuras extinções (Carolsfeld et al., 2003; O'Reilly et al., 2007). A pesquisa sobre criopreservação é conduzida principalmente pela busca de diluentes e crioprotetores apropriados para cada espécie (Lahnsteiner et al., 2010), por novas formas de avaliar e validar a eficácia dos crioprotetores e diluentes (Cabrita et al., 2014) e pelo fato dos espermatozoides serem células altamente específicas deste modo é necessário testar diferentes crioprotetores para diferentes espécies (Holt, 2000).

Realizamos um estudo cienciométrico focado na pesquisa de criopreservação de peixes para conservação *ex situ* da biodiversidade. Nossas principais questões são: Os protocolos de criopreservação para espécies ameaçadas incluem espécies que não são de interesse econômico? Há um aumento ao longo do tempo nas publicações relacionadas à criopreservação para conservação da biodiversidade? Quais são as biotécnicas mais estudadas em conjunto com a criopreservação que podem contribuir para a conservação das espécies? Quais são os principais países que publicaram sobre o assunto? Existe uma tendência temporal na qualidade ou visibilidade dos periódicos medidos pelo fator de impacto em que esses documentos foram publicados? Quais são as principais lacunas do estudo sobre esse assunto?

Material e Métodos

Utilizamos a base de dados Web of Science (Thomson Reuters) referente à produção bibliográfica de 1998 a 2017. Os dados foram coletados em maio de 2017. A análise foi realizada em quatro diferentes campos de busca correspondentes a quatro diferentes combinações de palavras, foram analisados os artigos que possuíam no título, resumo ou palavras-chave as seguintes combinações: campo 1 (*fish and cryopreservation and (endangered or threatened)*)*; campo 2 (*genetic variability and cryopreservation and fish*); campo 3: (*cryopreservation and fish*

and conservation and biodiversity)* campo 4 (*fish and cryopreservation*)*. Essas buscas retornaram 879 artigos, dos quais foram selecionados aqueles que: a - realizaram criopreservação de espermatozoides para conservação *ex situ* ou para espécies ameaçadas; b- utilizou outras células ou material biológico para criopreservação e atribuiu a importância para fins conservacionistas; c- fez uso de outras técnicas junto com criopreservação e atribuiu importância para fins conservacionistas; d- citou o uso de esperma criopreservado em projetos de conservação ou estudos de variabilidade genética para fins conservacionistas; e- artigos de revisão sobre criopreservação em peixes ou na conservação da biodiversidade de peixes que têm atribuído importância da criopreservação na conservação da biodiversidade. Pesquisas que não mencionaram a contribuição da criopreservação para a conservação da biodiversidade não foram incluídas na pesquisa, mesmo que as técnicas desenvolvidas possam ser usadas em prol da conservação da biodiversidade. Foram feitas análises dos artigos selecionados referentes à: (i) ano de publicação, (ii) periódico e fator de impacto, (iii) número de citações, (iv) país do primeiro autor, (v) espécies utilizadas para criopreservação e categoria de ameaça (vi) números de diferentes tipos de material biológico criopreservado (óvulos, embriões, células somáticas...) sem o uso de outras técnicas biológicas, (vii) número de técnicas biológicas usadas em conjunto com a criopreservação, (viii) número de artigos de revisão que citaram o uso da técnica para fins de conservação, (ix) número de artigos que abordaram estudos de variabilidade genética e criopreservação, (ix) número de artigos sobre programas de conservação que utilizavam criopreservação. Todas as espécies que tiveram esperma congelado foram classificadas nas categorias de ameaça da IUCN (2016). As espécies que ocorrem no Brasil foram classificadas de acordo com a lista brasileira (MMA, 2014). Para saber se as espécies encontradas na pesquisa são relevantes na aquicultura e pesca, foi utilizada a Lista de Espécies para Fins Estatísticos da Pesca (ASFIS, 2017) da Organização de Alimentos e Agricultura (FAO). Esta lista inclui 12 721 itens de espécies selecionados de acordo com a relação com a pesca e/ou aquicultura. Também

obtivemos os fatores de impacto dos periódicos no Journal Citation Reports (JCR) do ano de publicação de cada artigo. Usamos uma árvore de regressão para identificar possíveis tendências ao longo do tempo no número de artigos sobre criopreservação e conservação da biodiversidade de peixes. Esse método divide a variável preditora em segmentos compostos por valores similares da variável resposta (Barbosa et al., 2012).

Utilizamos a razão de contribuição ($\times 1000$) dos artigos em relação ao número total de artigos publicados no ano correspondente para todos os periódicos do banco de dados Web of Science. Posteriormente, os dados foram transformados em log e suavizados usando média móvel de 3 pontos no software PAST 2.17c para Windows (Hammer et al., 2001). Para testar se o fator de impacto dos periódicos nos quais os artigos foram publicados aumentou ao longo dos anos, padronizamos o fator de impacto de cada periódico dividindo pelo fator de impacto máximo da categoria correspondente no ano em que foi publicado, quando o a revista teve mais de uma categoria escolhemos a mais frequente dentro do levantamento para realizar a padronização.

Inicialmente, realizamos uma regressão linear. No entanto, devido ao arranjo triangular dos dados no gráfico de dispersão, foi realizado um teste de permutação para avaliar se esse padrão poderia ser gerado por acaso (Bardsley et al., 1999). O teste avalia simultaneamente se a média e a variação dos fatores de impacto aumentaram nos últimos anos. Utilizamos o software Ecosim (Gotelli e Entsminger, 2001), módulo "Macroecologia" para realizar a análise.

Resultados

Ao total, foram selecionados 90 artigos que se enquadram nos critérios da pesquisa. A análise de árvore de regressão (Fig. 1) dividiu a variável preditora (ano de publicação) em três segmentos, antes de 2007, entre 2007 e 2010 e depois de 2010. O segmento de 1998 a 2007 corresponde ao período com menos publicações com um aumento relativamente constante de documentos sobre criopreservação e conservação da biodiversidade. O segundo segmento (2007 a 2010) reflete o período com um aumento considerável no percentual de artigos publicados e o

terceiro período marca uma queda até o ano de 2014 com um posterior aumento até 2017. Um total de 46 revistas publicaram sobre questões relacionadas à criopreservação e conservação de biodiversidade de peixes, 31 periódicos contribuíram com apenas um artigo, 5 periódicos contribuíram com menos de 2 e 10 periódicos contribuíram com mais de dois artigos (Fig. 2a). A média e variação dos fatores de impacto das revistas que publicaram sobre criopreservação e conservação da biodiversidade de peixes mostraram um aumento das publicações em jornais com menores fatores de impacto ao longo do período (Fig. 2b), que é confirmado também após a aplicação do modelo de simulação de dados onde foi verificado uma tendência de diminuição (teste para arranjo triangular de dados, $P = 0,006$). Muitos artigos receberam de 1 a 5 citações (24 de 90), 32 artigos receberam de 6 a 15 citações e 23 receberam 16 ou mais citações, enquanto 11 não receberam citações (Fig. 3a). O artigo mais citado foi Fraser (2008) com 183 citações, seguido de Hangerdorn (2002) com 61 citações e Maria et al. (2006) com 57 citações. Depois de padronizar o número de citações por idade do artigo (dividir o número de citações pelo número de anos desde sua publicação) Fraser (2008), Lee et al. (2013) e Lacerda et al. (2010) foram os mais citados (Fig. 3b) . Pesquisas em 24 países publicaram sobre a criopreservação como uma importante técnica para a conservação da biodiversidade de peixes (Fig. 4a). Vinte artigos foram publicados por pesquisadores do Brasil seguidos do Japão (12) e Estados Unidos (9). Os espermatozoides foram a célula mais criopreservada com 55 artigos, seguidos por embriões, células somáticas e oócitos (Fig. 4b). A principal técnica estudada em conjunto com a criopreservação foi o transplante de células germinativas com 10 e androgênia com 2 publicações. Enquanto apenas um estudo realizou um estudo de variabilidade genética usando criopreservação, outros dois tratam de programas de conservação que usam criopreservação como ferramenta. No total, 47 espécies tiveram o esperma congelado para conservação ex situ e foram consideradas ameaçadas pelos pesquisadores. Os Cypriniforme e os Characiformes foram as ordens melhores representadas. As espécies *Brycon orbignyanus*, *Prochilodus magdalenae* e *Tork*

khudree tiveram maior frequência entre os estudos com criopreservação de espermatozoides (Tabela 1). Dezesete destas espécies não foram avaliadas pela IUCN (2016) ou pelo MMA (2014), 7 espécies estão na categoria de perigo (EN), 9 espécies são consideradas pouco preocupante (LC) e apenas 4 em perigo crítico (CR). Destas 47 espécies (Tabela 1), apenas 6 não foram encontradas no ASFIFS 2017, são as espécies brasileiras, *Salminus maxillosus* e *Pseudoplatystom corruscans* (Carolsfeld et al., 2003), uma espécie da América do Norte, *Ptychocheilus Luciu* (Tiersch et al. , 2004) e outra asiática *Varicorhinus macrolepis* (Ji et al., 2008), enquanto outras duas são espécies de aquários *Poecilia latipinna* e *Poecilia reticulata* (Huang et al., 2009)

Discussão

Nossos resultados mostram que houve um período de aumento nas publicações entre 2007 e 2010 em relação à criopreservação e conservação da biodiversidade de peixes, após um declínio com certa constância nas proporções das publicações. Se levarmos em conta o fator de impacto como uma medida de avaliação, os periódicos nos quais os trabalhos foram publicados mostraram uma tendência em diminuir a qualidade, tanto que os periódicos que mais contribuíram tiveram um fator de impacto menor em sua categoria, como a *Cryobiology*, especialista em criopreservação que contribuiu com 13 artigos. Como a pesquisa sobre criopreservação já vem de longa data começando na década de 50, o interesse dos periódicos de maior impacto podem ter diminuído com o passar do tempo.

A frequência de citação de artigos acadêmicos é frequentemente usada como parâmetro na avaliação da pesquisa (Yoshikane et al., 2013), embora os pesquisadores de cienciometria geralmente acreditem que as citações refletem a influência da pesquisa e não sua qualidade (Leydesdorff et al., 2014). Em nosso estudo, havia 11 publicações que não foram citadas, enquanto 24 de 90 receberam apenas de 1 a 5 citações. Garfield (2006) afirma que a maioria das publicações nunca é citada ou são citadas apenas algumas vezes. Essa tendência aparece em parte

na presente pesquisa, uma vez que muitos artigos tiveram poucas ou nenhuma citações, mas também houve 32 artigos que tiveram seis ou mais citações. Considerando a padronização de dados que exclui o fator idade de publicação, o artigo mais citado foi Frase (2008) que trata de uma ampla revisão sobre a conservação de salmonídeos em cativeiro, onde a técnica de criopreservação é citada como uma importante ferramenta. Outro artigo entre os mais citados é Lee et al. (2013), que estabelece uma metodologia capaz de derivar óvulos e espermatozoides funcionais de espermatogônias tipo A congeladas (ASGs) e Lacerda et al. (2010), onde descreve uma nova metodologia não cirúrgica para o transplante eficiente de espermatogônias nos testículos de tilápia adulta, segundo o autor é de grande valor para preservar ambos os genomas (materno e paterno) de espécies ameaçadas de extinção.

O Brasil, país com uma alta biodiversidade de peixes, obteve o maior número de primeiros autores, a pesquisa no Brasil é principalmente focado em espécies migratórias, que são ameaçadas principalmente por construções de barreira (Carosfeld et al., 2003, Maria et al., Souza et al., 2014). O Japão, que é o segundo país em número de primeiros autores, tem se destacado por décadas com biotecnologias de ponta (Bartholomew, 1997). Os Estados Unidos em terceiro lugar têm um alto investimento em infraestrutura e pesquisa, e também possui uma grande área geográfica com alta biodiversidade de peixes, dos quais muitas espécies estão ameaçadas (Warren e Burr, 1994). Destacam-se também os países com alta diversidade aquática, como a Índia e a China, e a menor participação de outros países em desenvolvimento, como a Malásia, a Colômbia e a Taiwan. Também destacamos a participação de Bangladesh, em quarto lugar na pesquisa, é o terceiro país da Ásia com maior diversidade aquática e onde há esforços para criar criobancos para a conservação de espécies (Bart, 2002).

Publicações que usaram espermatozoides para criopreservação são de longe o maior número dentro da pesquisa, embora a técnica tenha sido aplicada com sucesso em espermatozoides de muitas espécies de peixes, faltam métodos viáveis para a preservação em

longo prazo de ovos e embriões (Cabrita et al., 2010). Foram levantados 2 estudos sobre a viabilidade da criopreservação de células somáticas, os autores afirmam que, quando gametas e embriões não estão disponíveis, um criobanco de tecidos somáticos é uma possibilidade de manter um registro de valor genético de peixes em um contexto de conservação da biodiversidade (Maugeret et al., 2006; Moritz et al., 2008). A técnica mais utilizada juntamente com a criopreservação, com o total de 10 publicações levantadas, é o transplante de células germinativas, que tem se mostrado mais promissor em relação aos oócitos e embriões na tentativa de preservar tanto as partes maternas quanto paternas da espécie (Kobayashi et al., 2007; Lacerda et al., 2010; Yoshizaki et al., 2011).

Desta forma, técnicas de congelamento de diferentes linhagens germinativas (células germinativas primordiais, espermatogônias, produção de quimera) podem ser desenvolvidas. Essa técnica de criopreservação deve estar associada ao transplante em hospedeiros antes que o sistema imunológico se desenvolva, a fim de gerar óvulos e espermatozoides viáveis (Kobayashi et al., 2007). Uma combinação de transplante espermatogônico e criopreservação pode ser uma ferramenta poderosa para preservar linhagens de peixes valiosas com características genéticas desejáveis assim como para espécies ameaçadas (Yoshizaki et al., 2011; Swanson et al., 2008). A segunda técnica com o maior número de pesquisas é a androgênese, uma forma de manipulação de conjuntos cromossômicos que é bem estudada em peixes, é induzida de forma semelhante à tetraploidia, exceto que os cromossomos maternos são inativados por irradiação e que após dobrar o núcleo paterno em a primeira mitose gera homozigose completa. Este processo levanta a possibilidade de recuperar linhas de pesquisa perdidas ou espécies extintas. Se espermatozoides criopreservados estiverem disponíveis a partir de uma determinada linhagem ou espécie, ele pode ser usado para produzir progênes homozigotas por androgênese irradiando o óvulo por outra linhagem ou espécies diferentes (Tiersch, 2001). A criopreservação permite a análise da variabilidade genética do material biológico enquanto outra parte é armazenada para uso potencial

(Fopp-Bayat e Andrzej, 2012). Uma clara lacuna na pesquisa é apenas uma publicação que utilizou criopreservação para variabilidade genética em estudos de conservação, essas pesquisas são importantes porque as espécies criadas em cativeiro e os programas de reintrodução têm altos riscos genéticos associados, como depressão na variabilidade genética, derivas entre outros (Favé et al., 2008). Duas publicações relatam programas de conservação de peixes em que a criopreservação é uma ferramenta adotada, Wang et al. (2011), trata sobre práticas de conservação do esturjão chinês (*Acipenser sinensis*), uma espécie protegida pelo governo da China e Akbulut et al. (2011), que trata do potencial de reabilitação de populações de esturjão em águas turcas.

A maioria das espécies do levantamento estão entre as categorias de ameaça pouco preocupante (LC) ou em perigo (EN). Muitos não foram avaliados pelo ICUN (2016) ou pelo MMA (2014), mas a importância da criopreservação para a conservação foi citada como a conservação de estoques ameaçados de populações (Jesenet al., 2008), a criação de protocolos para conservação de grupos de espécies (Huang et al., 2009) ou de conservação ex situ para a conservação da biodiversidade (Carosfeld et al., 2003; Tian et al., 2008). Outras espécies que não foram classificadas como ameaçadas pela ICUN (2016) são consideradas ameaçadas de extinção na China como *V. variegatus* (Tian et al., 2008) e na Malásia *T. douronensis* (Chew et al., 2010b). A espécie com maior frequência é a *B. orbignyanus*, uma espécie migratória ameaçada de extinção no Brasil e tem grande potencial para programas de aquicultura e programas de repovoamento (Maria et al., 2006). Apenas quatro espécies foram consideradas criticamente ameaçadas, provavelmente porque os estudos de criopreservação são principalmente focados em espécies comerciais, então a grande maioria das espécies com espermatozoides criopreservados também tem potencial para aquicultura ou pesca, conforme verificado na Lista Estatística da Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (ASFIS, 2017) onde a maioria das espécies nesta pesquisa foi encontrada. Entre as poucas espécies que não estavam na lista ainda temos duas

espécies de aquários as quais podemos considerar que possuem valor comercial. Também enfatizamos que é mais simples testar protocolos de criopreservação para espécies em cativeiro do que para animais silvestres.

Apesar da crescente preocupação com a conservação da biodiversidade da fauna aquática, a pesquisa sobre criopreservação focada na conservação de espécies de peixes apresentou uma queda na visibilidade considerando o fator de impacto como medida, porém a criopreservação já é utilizada como parte de programas de conservação em muitos países (Bart, 2002; Akbulut et al., 2011; Wang et al., 2011). Acreditamos que cada vez mais farão parte de programas de conservação ex situ e do restabelecimento de populações silvestres pela possibilidade de manejo da variabilidade genética, mas é necessário aumentar o número de pesquisas sobre a possibilidade de tal manejo utilizando a criopreservação. De certa forma, a criopreservação de espermatozoides de peixe pode ser considerada um seguro importante, especialmente para populações humanas, contra a extinção de espécies de importância econômica.

Referências

- ABED-ELMDOUST, A., FARAHMAND, H., MOJAZI-AMIRI, B., RAFIEE, G. and RAHIMI, R., 2015. Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquaculture research*, vol. 46, no.10, pp.2392-2397. <http://dx.doi: 10.1111/are.12397>.
- ABED-ELMDOUST, A., FARAHMAND, H., MOJAZI-AMIRI, B., RAFIEE, G. and RAHIMI, R., 2017. Metabolic changes in droplet vitrified semen of wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1997). *Cryobiology*, vol. 76, pp.111-118. <http://dx.doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.03.008>.
- AGUILAR-JUÁREZ, M., RUIZ-CAMPOS, G. and PANIAGUA-CHÁVEZ, C.G., 2014. Cold storage of the sperm of the endemic trout *Oncorhynchus mykiss nelsoni*: a strategy for short-term germplasm conservation of endemic species. *Revista Mexicana de Biodiversidade*, vol. 85, no. 1, pp. 294-300. <http://dx.doi: 10.7550/rmb.36352>
- AKBULUT, B., ZENGIN, M., ÇIFTÇI, Y., USTAOĞLU TIRIL, S., MEMİĞ, D., ALKAN, D. and EROĞLU, O. , 2011. Stimulating sturgeon conservation and rehabilitation measures in Turkey: an overview on major projects (2006–2009). *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 27, no. 2, pp. 415-419. <http://dx.doi: 10.1111/j.1439-0426.2011.01736>.

ARAMLI, M.S., 2014. Retracted: ATP Content, Oxidative Stress and Motility of Beluga (*Huso huso*) Semen: Effect of Short-Term Storage. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 49, no.4, pp. 636-640. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13124>.

ASFIS, 2017. List of Species for Fishery Statistics Purposes. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en>. (download made in January, 2018).

ATENCIO GARCÍA, V.J., ESPINOSA, J.A., MARTÍNEZ, J G. and PARDO CARRASCO, S.C., 2015. Insemination of bocachico fish (*Prochilodus magdalenae*) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, vol. 28, no.4, pp.347-355. <http://dx.doi:10.17533/udea.rccp.v28n4a07>.

BARBOSA, F.G., SCHNECK, F., and MELO, A.S., 2012. Use of ecological niche models to predict the distribution of invasive species: a scientometric analysis. *Brazilian Journal of Biology*, vol.72, no.4, pp. 821-829. <http://dx.doi:10.1590/S1519-69842012000500007>.

BARDSLEY, W.E., JORGENSEN, M.A., ALPERT, P. and BEN-GAI, T.,1999. A significance test for empty corners in scatter diagrams. *Journal of Hydrology*, vol. 219, no.2, pp. 1-6, [http://dx.doi:10.1016/S0022-1694\(99\)00043-8](http://dx.doi:10.1016/S0022-1694(99)00043-8).

BART, A., 2002. Conservation of fish genetic diversity: need for development of a cryogenic genebank in Bangladesh. In *Proceedings of a workshop on genetic management and improvement strategies for exotic carps in Asia*. February14-16, ASIA, 2002, pp. 12-14.

BARTHOLOMEW, S., 1997. National systems of biotechnology innovation: complex interdependence in the global system. *Journal of international business studies*, vol. 28, no.2, no. 241-266. <http://dx.doi:10.1057/palgrave.jibs.8490100>.

BASAVARAJA, N. and HEGDE, S.N., 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology*, vol. 49, no.2, pp.149-156. <http://dx.doi:10.1016/j.cryobiol.2004.05.007>

BASAVARAJA, N., HEGDE, S.N. and PALAKSHA, K.J., 2006. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: effect of dimethyl sulfoxide, freezing, activating media, and cryostorage on post-thaw spermatozoa motility and fertility. *Cell Preservation Technology*, vol.4, no.1, pp.31-45. <http://dx.doi:10.1089/cpt.2006.4.31>.

BLAXTER, J.H.S., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, vol. 172, no.4391, p.1189.

BUTTS, I.A., FEINDEL, N., NEIL, S., KOVÁCS, É., URBÁNYI, B. and TRIPPEL, E. A., 2011. Cryopreservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm in large-volume straws: applications for commercial production and gene banking. *Aquaculture Research*, vol. 42, no.11, pp.1714-1722. <http://dx.doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02769.x>.

CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRAO, J., PÉREZ-CEREZALES, S. and HERRÁEZ, M.P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, vol.26, no.5, pp. 623-635. [http://dx.doi: 10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x](http://dx.doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x).

CABRITA, E., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., GAVAIA, P.J., RIESCO, M.F., VALCARCE, D.G., SARASQUETE, C. and Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, vol. 432, pp. 389-401. <http://dx.doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>.

CAROLSFELD, J., GODINHO, H.P., ZANIBONI FILHO, E. and HARVEY, B.J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, vol. 63, vol. 2, pp. 472-489. <http://dx.doi:10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.

CESP (Companhia Energética de São Paulo). 2006. 40 Peixes do Brasil. CESP 40 anos. Rio de Janeiro, Doiis, 208p

CHEW, P.C., HASSAN, R., RASHID, Z.A., and CHUAH, H.P., 2010a. The current status of sperm cryopreservation of the endangered *Probarbus jullieni* (Sauvage) in Malaysia. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 26, no.5, pp.797-805. [http://dx.doi: 10.1111/j.1439-0426.2010.01539.x](http://dx.doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01539.x).

CHEW, P.C., ABD-RASHID, Z., HASSAN, R., ASMUNI, M., and CHUAH, H.P., 2010b. Semen cryobank of the Malaysian Mahseer (*Tor tambroides* and *T. douronensis*). *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 26, no.5, pp.726-731. <http://dx.doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01539.x>.

CIERESZKO, A., DIETRICH, G.J., WOJTCZAK, M., SOBOCKI, M., HLIWA, P., KUŹMIŃSKI, H. and NYNCA, J., 2008. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen from Lake Łebsko, Poland. *Fundamental and Applied Limnology*, vol. 173, no.1, pp.59-65. <http://dx.doi:10.1127/1863-9135/2008/0173-0059>.

CRUZ-CASALLAS, P.E., PARDO-CARRASCO, S.C., ARIAS-CASTELLANOS, J.A., LOMBO-CASTELLANOS, P.E., LOMBO-RODRÍGUEZ, D.A and PARDO-MARIÑO, J.E., 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 35, no.4, pp. 529-535. <http://dx.doi:10.1111/j.1749-7345.2004.tb00120.x>.

DALY, J., GALLOWAY, D., BRAVINGTON, W., HOLLAND, M., and INGRAM, B., 2008. Cryopreservation of sperm from Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture*, vol. 285, no.4, vol. 117-122. <http://dx.doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.023>.

FAVÉ, M.J., and TURGEON, J. 2008. Patterns of genetic diversity in Great Lakes bloaters (*Coregonus hoyi*) with a view to future reintroduction in Lake Ontario. *Conservation Genetics*, vol.9, no.2, pp.281-293. <http://dx.doi:10.1007/s10592-007-9339-6>.

FOPP-BAYAT, D., and CIERESZKO, A., 2012. Microsatellite genotyping of cryopreserved spermatozoa for the improvement of whitefish semen cryobanking. *Cryobiology*, vol. 65, no.3, pp.196-201. <http://dx.doi:10.1016/j.cryobiol.2012.06.003>.

- FRASER, D.J., 2008. How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evolutionary Applications*, vol. 1, no. 4, pp.535-586. <http://dx.doi:10.1111/j.1752-4571.2008.00036.x>.
- GALO, J.M., STREIT-JUNIOR, D.P., SIROL, R.N., RIBEIRO, R.P., DIGMAYER, M., ANDRADE, V.X.L., and EBERT, A.R., 2011. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyianus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Brazilian Journal of Biology*, pp.71, no. 3, pp. 693-699. <http://dx.doi:10.1590/S1519-69842011000400014>.
- GARFIELD, E., 2006. The history and meaning of the journal impact factor. *Jama*, vol. 295, no.1, pp.90-93. <http://dx.doi:10.1001/jama.295.1.90>.
- GREER, D. S.; HARVEY, B. J., 2004: Blue genes: sharing and conserving the world's aquatic biodiversity. Earthscan, 231p.
- GOTELLI, N.J., ENTSMINGER, G.L., 2001. [viewed 5 May 2017] EcoSim: Null models software for ecology. version 7.0. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. Available from: <<http://homepages.together.net/~gentsmin/ecosim.htm>>.
- GWO, J.C., OHTA, H., OKUZAWA, K., and WU, H.C.,1999. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology*, vol. 51, no. 3, pp.569–582. [http://dx.doi:10.1016/S0093-691X\(99\)00011-4](http://dx.doi:10.1016/S0093-691X(99)00011-4).
- HARVEY, B., 1999. Fish genetic conservation in Canada and Brazil: field programs and policy development, pp. 17–22. In Pullin, R.S.V.; Bartley, D.M.; Kooiman, J., (eds.). *Towards policies for conservation and sustainable use of aquatic genetic resources*. ICLARM Conf. Proc. 277 p.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., and RYAN, P.D.,2001 . Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Eletrônica*, (4).
- HORVÁTH, Á., JESENĚK, D., CSORBAI, B., BOKOR, Z., RABOCZKI, É., KACZKÓ, D. and SNOJ, A., 2012. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture*, vol. 358, pp. 213-215. <http://dx.doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.012>.
- HOLT, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, vol. 53, pp47-58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3).
- HUANG, C.,SUN, C., SU, X.,ZHAO, X., MIAO, M., LIU, Y. and DONG, Q., 2009. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies a generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. *Cryobiology* , vol. 59, pp. 351–356. <http://dx.doi:10.1016/j.cryobiol.2009.09.011>.
- IUCN, 2016: IUCN red list of threatened species. [viewed 16 October 2016].Version 2016–3 Available from: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/236/0>
- JENSEN, N. R., ZUCCARELLI, M. D., PATTON, S. J., WILLIAMS, S. R., IRELAND, S.C. and CAIN, K.D., 2008. Cryopreservation and methanol effects on Burbot sperm motility and egg fertilization. *North American Journal of Aquaculture*, vol. 70, no.1, pp.38-42. <https://doi.org/10.1577/A06-082.1>.

- JI, X.S., ZHAO, Y., CHEN, S.L., JIANG, Y.L., WANG, H. SONG, J.Y., DING, L. and CHEN, H.J., 2008. Successful fertilization of *Varicorhinus macrolepis* eggs with sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*, vol. 69, pp.793-797. <http://dx.10.1016/j.theriogenology.2007.10.022>.
- KOBAYASHI, T., TAKEUCHI, Y., TAKEUCHI, T., and YOSHIZAKI, G., 2007. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 74, pp. 207-213. <https://10.1002/mrd.20577>.
- LACERDA, S.M., BATLOUNI, S.R., COSTA, G.M., SEGATELLI, T.M., QUIRINO, B. R., QUEIROZ, B.M. and FRANÇA, L.R., 2010. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PloS one*. vol. 5, e10740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010740>.
- LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N. and CABERLOTTO, S., 2010. Composition and metabolism of carbohydrates and lipids in *Sparus aurata* semen and its relation to viability expressed as sperm motility when activated. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, vol. 157, pp. 39-45. [https:// DOI: 10.1016/j.cbpb.2010.04.016](https://DOI:10.1016/j.cbpb.2010.04.016).
- LE FRANÇOIS, N.R., LAMARRE, S.G., TVEITEN, H., BLIER, P.U. and BAILEY, J., 2008. Sperm cryoconservation in *Anarhichas* sp., endangered cold-water aquaculture species with internal fertilization. *Aquaculture International*, vol. 16, pp.273-279. <https://10.1007/s10499-007-9137-7>.
- LEE, S., IWASAKI, Y., SHIKINA, S. and YOSHIZAKI, G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, pp.1640-1645. <https://10.1073/pnas.1218468110>.
- LEYDESDORFF, L., BORNMANN, L., MARX, W. and MILOJEVIC, S., 2014. Referenced publication years spectroscopy applied to iMetrics. *Scientometrics. Journal of Informetrics*, vol. 8, pp.162-174. <https://doi.org/10.1016/j.joi.2013.11.006>.
- LINHART, O., RODINA, M. and COSSON, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, vol. 41, pp. 241-250. <https://doi:0.1006/cryo.2000.2284>.
- LINHART, O., RODINA, M., FLAJSHANS, M., Gela, D., and KOCOUR, M., 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology*, vol. 51, no. 3, pp. 250-261. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.005>.
- MAITLAND, P.S., 1995. The conservation of freshwater fish: past and present experience. *Biological Conservation*. vol. 72, pp. 259-270. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(94\)00088-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)00088-8).
- MARIA, A. N., VIVEIROS, A.T.M., FREITAS, R.T.F. and OLIVEIRA, A.V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, vol. 260, pp.298-306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.011>.

- MARTÍNEZ, P.S., BARBOSA, V., PÉREZ, C.S., ROBLES, V. and HERRÁEZ, M.P., 2009. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, vol. 58, pp.128-133. <https://doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.013>.
- MARTÍNEZ, J.G., GARCÍA, V. A. and CARRASCO, S.P., 2012. DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi: Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. *Neotropical Ichthyology*, vol. 10, no.3, pp.577-586. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252012005000018>.
- MARTÍNEZ, J.G. and PARDO, C., 2013. Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Revista MVZ Córdoba*, vol. 18, pp.3295–3303.
- MAUGER, P.E., LE, B.P.Y. and LABBÉ, C., 2006. Cryobanking of fish somatic cells: optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, vol. 144, pp.29-37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.01.004>.
- MMA, 2014. [viewed 1 December 2016] Lista Oficial das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção e Sobre explorados ou Ameaçados de Sobre-exploração Available at: <http://scientific.thomsonreuters.com/imgblast/JCR FullCovlist -2016.pdf>.
- MORITZ, C. and LABBE, C., 2008. Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. *Cryobiology*, vol. 56, pp.181-188. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.01.004>.
- NASCIMENTO, R. V., LEITE-CASTRO, L. V., MONTENEGRO, A. R., OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S., LOPES, J. T., de ALMEIDA-MONTEIRO, P. S., and SALMITO-VANDERLEY, C.S.B., 2017. Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* semen. *Acta Scientiae Veterinariae*, vol. 45, no. 1, p. 9. <https://doi: 10.22456/1679-9216.80488>.
- NAHIDUZZAMAN, M. HASSAN, M.M., KHANAM, U.H. MAMUN, S.N.A.,HOSSAIN, M.A. and TIERSCH, T.R., 2011: Sperm cryopreservation of the critically endangered olive barb, *Sarpunti Puntius sarana*, (Hamilton, 1822). *Cryobiology*, vol.62, pp.62-67. <https://doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.12.004>.
- NAHIDUZZAMAN, M., HASSAN, M.M., ROY, P. K., HOSSAIN, M.A., HOSSAIN, M.A.R. and TIERSCH, T.R., 2012. Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. *Animal Reproduction Science*, vol. 136, pp.133-138. <https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.023>.
- NUNES, L.T., OLIVEIRA, M.S., LOPES, J.T., de SOUZA, M.E.M., PINHEIRO, R.R. R., CAMPELLO, C.C. and VANDERLEY, C.S.B.S., 2016. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 37, no.3, pp.1643-1653. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n3p1643>.
- NYNCA, J., DIETRICH, G.J., GRUDNIEWSKA, J., DOBOSZ, S., LISZEWSKA, E., KRZYŚ, M., CIERESZKO, A., 2015. Efficient method for cryopreservation of European huchen (*Hucho hucho* L.) and grayling (*Thymallus thymallus* L.) semen. *Aquaculture*, vol. 435, pp.146-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.031>.

- ORFÃO, L.H., NASCIMENTO, A.F., CORRÊA, F.M., COSSON, J. and VIVEIROS, A.T., 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture*, vol. 311, pp. 241-247 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.041>.
- O'REILLY, P. and DOYLE, R. W., 2007. Live gene banking of endangered populations of Atlantic salmon. *The Atlantic Salmon: Genetics, Conservation and Management*, p. 346-380, <https://doi.org/10.1002/9780470995846.ch14>.
- OHTA, H., KAWAMURA, K., UNUMA, T., and TAKEGOSHI, Y., 2001. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *Journal of Fish Biology*, vol. 58, no.3, pp.670-681. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00521.x>.
- PATIL, R., and LAKRA, W. S., 2005. Effect of cryoprotectants, equilibration periods and freezing rates on cryopreservation of spermatozoa of mahseer, *Tor khudree* (Sykes) and *T. putitora* (Hamilton). *Aquaculture research*, vol. 36, no.15, pp.1465-1472. <https://doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01331.x>.
- PATIL, R., LAKRA, W.S., JAHAGEERDAR, S., KRISHNA, G., and PAL, A.K., 2016. Studies on fresh milt parameters and cellular changes during cryopreservation of spermatozoa of Deccan mahseer *Tor khudree* (Sykes, 1839). *Indian Journal of Fisheries*, vol. 63 no.1. <https://DOI:10.21077/ijf.2016.63.1.52060-09>.
- PULLIN, R.S., DANTING, B.J. and LONGALONG, C. F., 1998. Gene Banking for Fish and Other Aquatic Organisms: ICLARM's Perspectives and Experiences pp. 31–43. In Harvey, B.; Carmen, R.; Greer, D.; Carolsfeld, Joachim., eds.. *Action before extinction*. World Fisheries Trust. Conf. Proc. P. 250.
- RAHMAN, M.M., ALI, M.R., SARDER, M.R.I., MOLLAH, M.F.A. and KHAN, N.S., 2016. Development of sperm cryopreservation protocol of endangered spiny eel, *Mastacembelus armatus* (Lacepede 1800) for ex-situ conservation. *Cryobiology*, vol. 73, no. 3, pp.316-323. <https://doi:10.1016/j.cryobiol.2016.10.004>.
- RAHIMI, R., HAJIREZAEI, S., SHALUEI, F., and KABOUTARI KATADJ, J., 2016. Antibiotics, Penicillin and Streptomycin improve semen quality indices of endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1870) during in vitro short-term storage. *Aquaculture Research*, vol. 47, no.11, pp. 3662-3666. <https://doi.org/10.1111/are.12819>.
- ROUTRAY, P., CHOUDHARY, A.K., DASH, S.N., VERMA, D.K., DASH, C., SWAIN, P. and SARANGI, N., 2006, Cryopreservation of dead fish spermatozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful utilization in fish production. *Aquaculture*, vol. 261, pp.1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.029>.
- SARDER, M.R.I., SARKER, M.M., and SAHA, S.K., 2012. Cryopreservation of sperm of an indigenous endangered fish species *Nandus nandus* (Hamilton, 1822) for ex-situ conservation. *Cryobiology*, vol. 65. No. 3, pp. 202-209. <https://doi:10.1016/j.cryobiol.2012.06.004>.
- SILVA de ALMEIDA-MONTEIRO, P., SETÚBAL, O.A. M., Ribeiro, P.R.R., TRUGILIO, L.J.M. Ferreira, Y., Rubens Montenegro, A., and SALMITO-VANDERLEY, B.C. S., 2017. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis*

(Prochilodontidae, Teleostei). Semina: Ciências Agrárias, vol. 38 no. 4. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2669>.

SOUZA ANDRADE, E.P., APARECIDA, D. O. F., MURGAS, L.D.S. and VERAS, G.C., 2014. Milt Cryopreservation for Rheophilic Fish Threatened by Extinction in the Rio Grande, Brazil. *CryoLetters*, vol. 35, no.1, pp. 8-14.

SWANSON, P., CAMPBELL, B., SHEARER, K., DICKEY, J., BECKMAN, B., LARSEN, D. and BEREJIKIAN, B., 2008. Application of reproductive technologies to captive breeding programs for conservation of imperiled stocks of Pacific salmon. *Cybium*, vol. 32, pp. 279-282.

TSAI, S. and LIN, C., 2012. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. vol. 55, pp. 425-434. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000300014>.

TIAN, Y.S., CHEN, S.L., JI, X.S., Zhai, J.M., Sun, L.J., Chen, C. Su, P. Z., 2008. Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. *Aquaculture*, vol. 284, pp. 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.047>.

TIERSCH, T. R., 2001: Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine biotechnology* vol. 3, pp. 212–23. <https://doi: 10.1007/s10126001-0044-z>.

TIERSCH, T. R., FIGIEL, C.R., WAYMAN, W.R., WILLIAMSON, J. H., GORMAN, O. T. and CARMICHAEL, G. J., 2004. Cryopreservation of sperm from the endangered *Colorado pikeminnow*. *North American Journal of Aquaculture*, vol. 66, pp.8-14. <https://doi.org/10.1577/C02-043>.

VIVEIROS, A.T., MARIA, A.N., ORFAO, L.H., CARVALHO, M.A.M., and NUNES, J. F., 2008. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. *Cybium-International Journal of Ichthyology*, vol.32, p.215.

VIVEIROS, A.T., ISAÚ, Z.A., FIGUEIREDO, H.C., LEITE, M.A. and MARIA, A.N., 2010. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 41, pp.57-65. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00333.x>.

VIVEIROS, A.T., AMARAL, T.B., ORFÃO, L.H., ISAÚ, Z.A., CANEPPELE, D. and Leal, M.C, 2011. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research*, vol. 42 no.6, pp.858-865. <https://doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x>.

VIVEIROS, A.T.M., ISAÚ, Z.A., CANEPPELE, D. and LEAL, M.C., 2012. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology*, vol. 78, pp.803–810. <https://DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.028>.

VIVEIROS, A.T. NASCIMENTO, A.F. LEAL, M.C. GONÇALVES, A. C. ORFÃO, L. H., and COSSON, J., 2015. 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, vol. 41, no. 1, pp.193-201. [https://doi: 10.1007/s10695-014-0016-7](https://doi.org/10.1007/s10695-014-0016-7).

WANG, J.H., WEI, Q.W., and ZOU, Y.C., 2011. Conservation strategies for the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: an overview on 30 years of practices and future needs. Journal of applied ichthyology, vol. 27, no. 2, pp.176-180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01716.x>.

WAYMAN, W.R., LOONEY, G.L., HOLM, R.J. and TIERSCH, T.R., 2008. Cryopreservation of sperm from endangered pallid sturgeon. North American Journal of Fisheries Management, vol. 28, no.3, pp.740-744. <https://doi.org/10.1577/M06-161.1>.

YOSHIKANE, F.,SUZUKI, Y., ARAKAWA, Y., IKEUCHI, A. and TSUJI, K., 2013. Multiple regression analysis between citation frequency of patents and their quantitative characteristics. Procedia-Social and Behavioral Sciences, vol. 73, pp.217-223. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2013.02.044>.

YANG, H., HAZLEWOOD, L., HEATER, S.J., GUERRERO, P.A., WALTER, R.B., and TIERSCH, T. R., 2007. Production of F1 interspecies hybrid offspring with cryopreserved sperm from a live-bearing fish, the swordtail *Xiphophorus helleri*. Biology of reproduction, vol. 76, no. 3, pp.401-406. <https://doi: 10.1095/biolreprod.106.056549>.

YANG, H. and TIERSCH, T. R., 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and xiphophorus. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology, vol. 149, pp. 224-232. <https://doi: 10.1016/j.cbpc.2008.07.005>.

YOKOI, K., OHTA, H., and HOSOYA, K., 2008. Sperm motility and cryopreservation of spermatozoa in freshwater gobies. Journal of Fish Biology, vol. 72, no.3, pp.534-544. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01719.x>.

YOSHIZAKI, G., FUJINUMA, K., IWASAKI, Y., OKUTSU, T., SHIKINA, S., YAZAWA, R. and TAKEUCHI, Y., 2011. Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. Comparative Biochemistry and Physiology D: Genomics and Proteomics, vol. 6, pp.55-61. <https://doi: 10.1016/j.cbd.2010.05.003>

WARREN Jr, M.L. and BURR, B.M.,1994, Status of freshwater fishes of the United States: overview of an imperiled fauna. Fisheries, vol. 19, pp.6-18. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1994\)019<0006:SOFFOT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1994)019<0006:SOFFOT>2.0.CO;2).

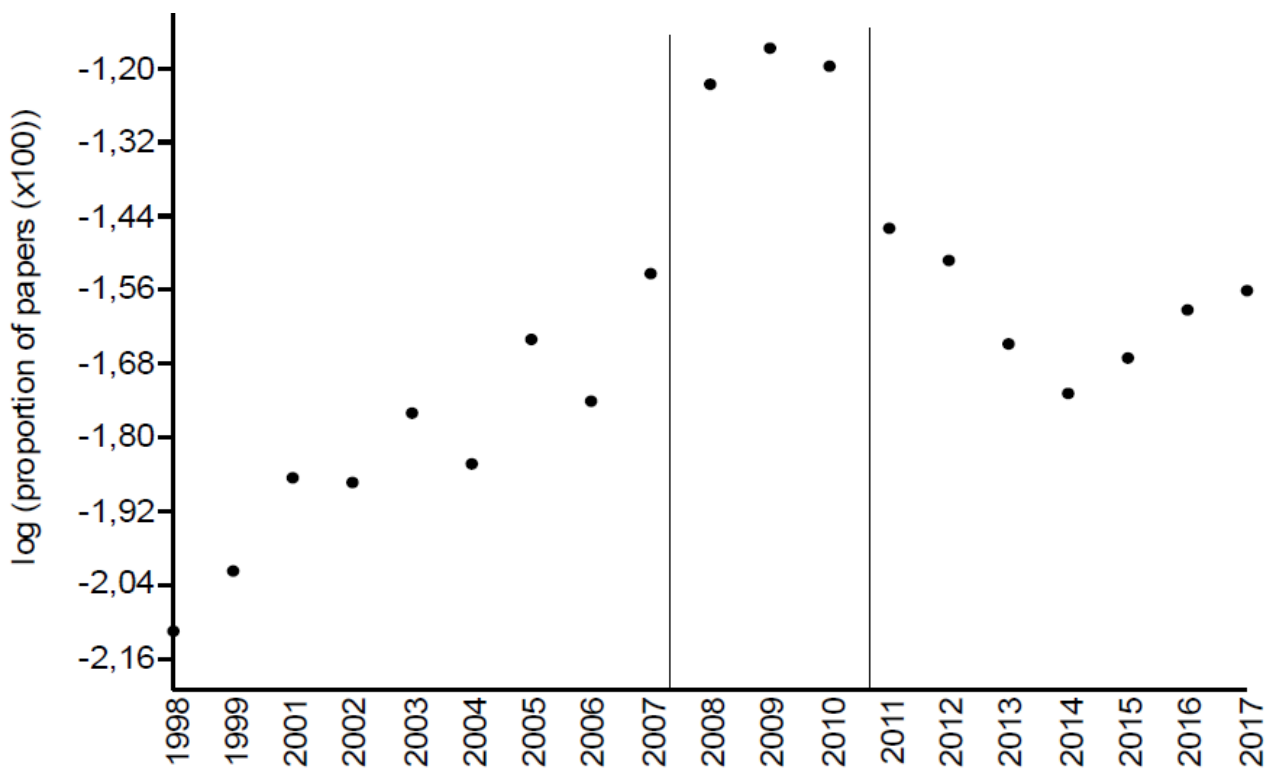


Fig. 1. log de proporção de artigos ($\times 1000$) sobre a criopreservação relacionada à conservação da biodiversidade de peixes em relação ao número total de artigos publicados de 1998 a 2017 indexados pela Web of Science. A linha tracejada indica o período entre o ano de 2007 e 2010 no qual a árvore de regressão particionou os dados em três segmentos.

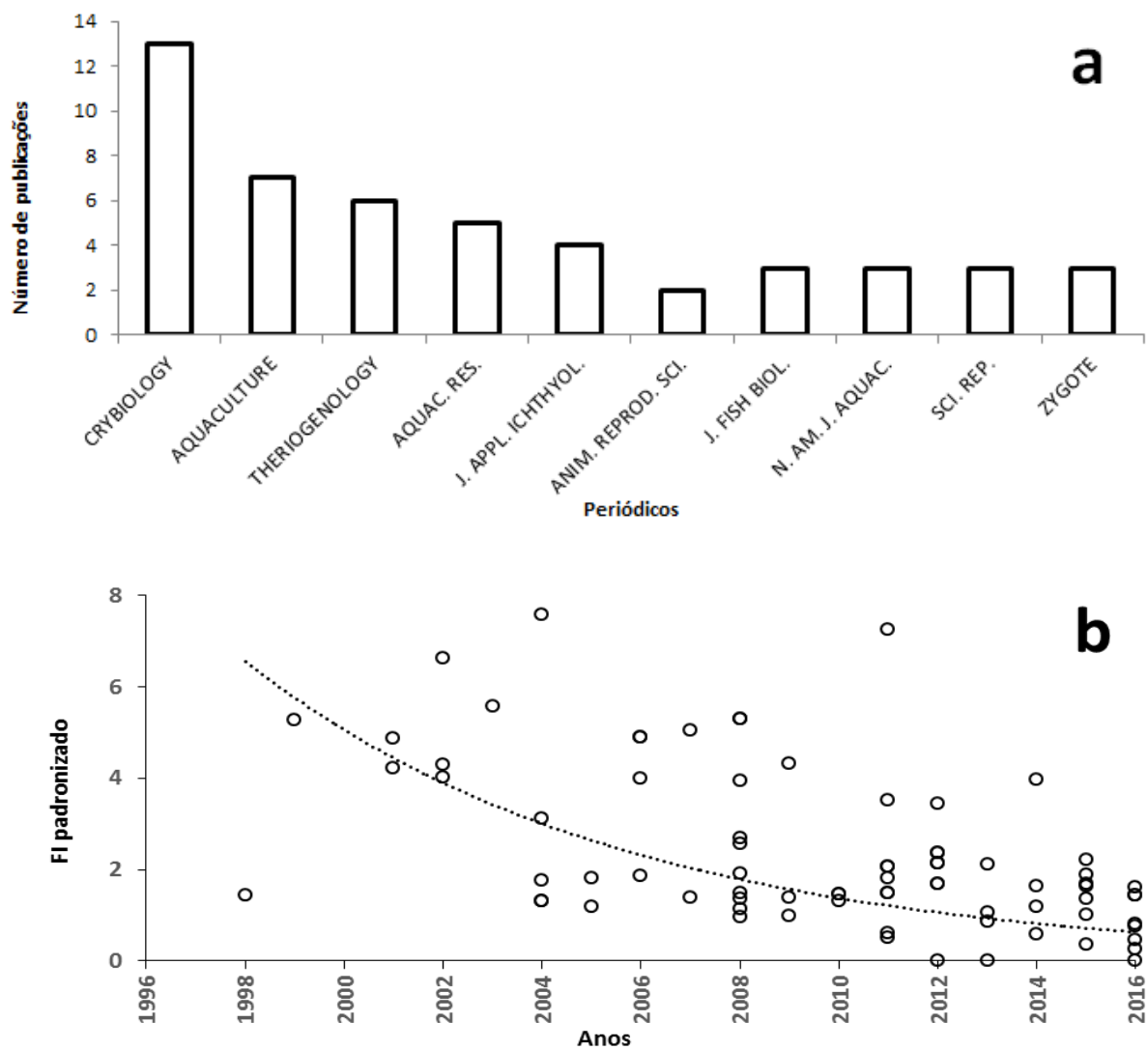


Fig. 2. Revistas que publicaram mais de dois artigos sobre criopreservação relacionados à conservação da biodiversidade de peixes indexados na Web of Science de 1998 a 2017 (a) e variação temporal no fator de impacto padronizado (fator de impacto do periódico em um dado ano dividido pelo o fator de impacto máximo de um periódico na categoria corresponde no mesmo ano), teste para arranjo triangular de dados, $P = 0,006$ (b).

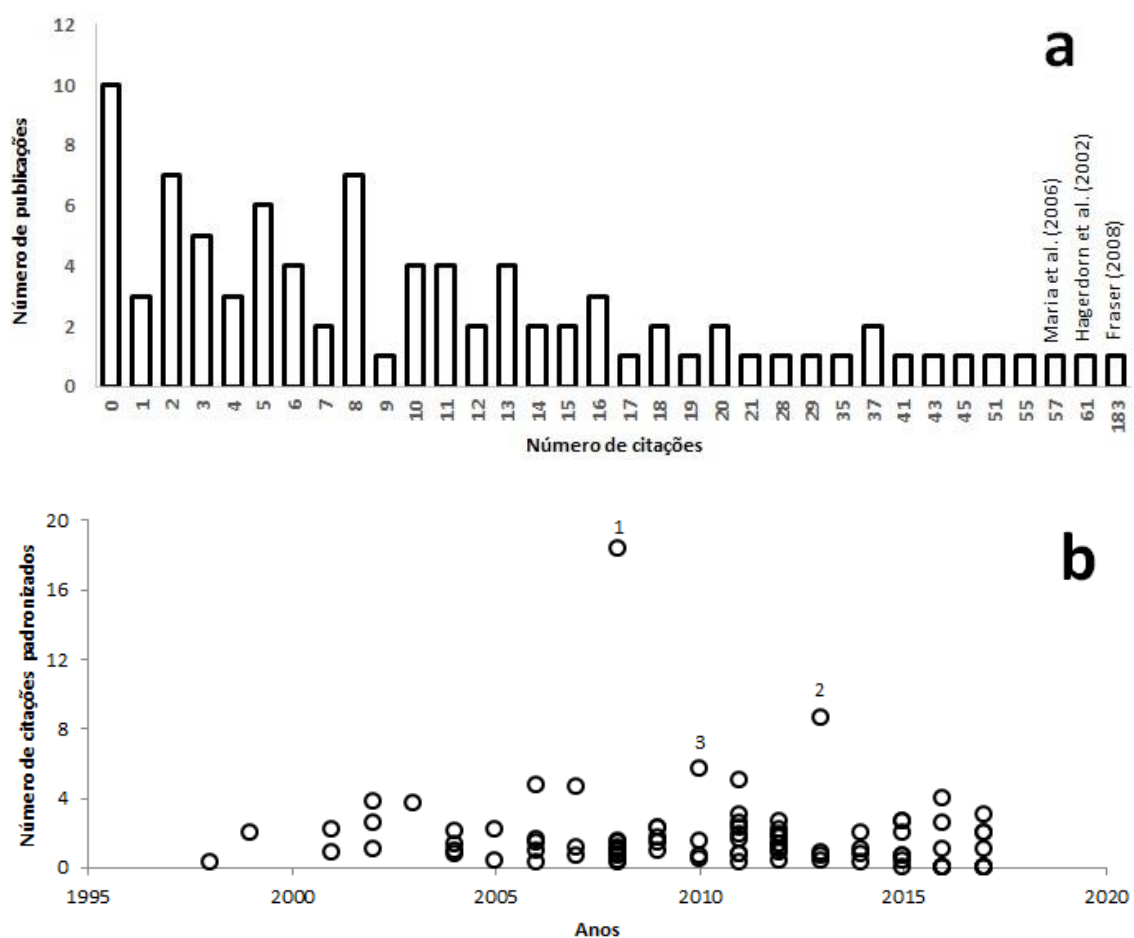


Fig. 3. Número de artigos em relação ao número de citações recebidas (a). Variação temporal no número padronizado (número de citações dividido pelo número de anos desde a publicação do artigo) número de citações recebidas por cada artigo (b). Os números em b são: 1 = Fraser (2008); 2 = Lee et al. (2013); 3 Lacerda et al. (2010).

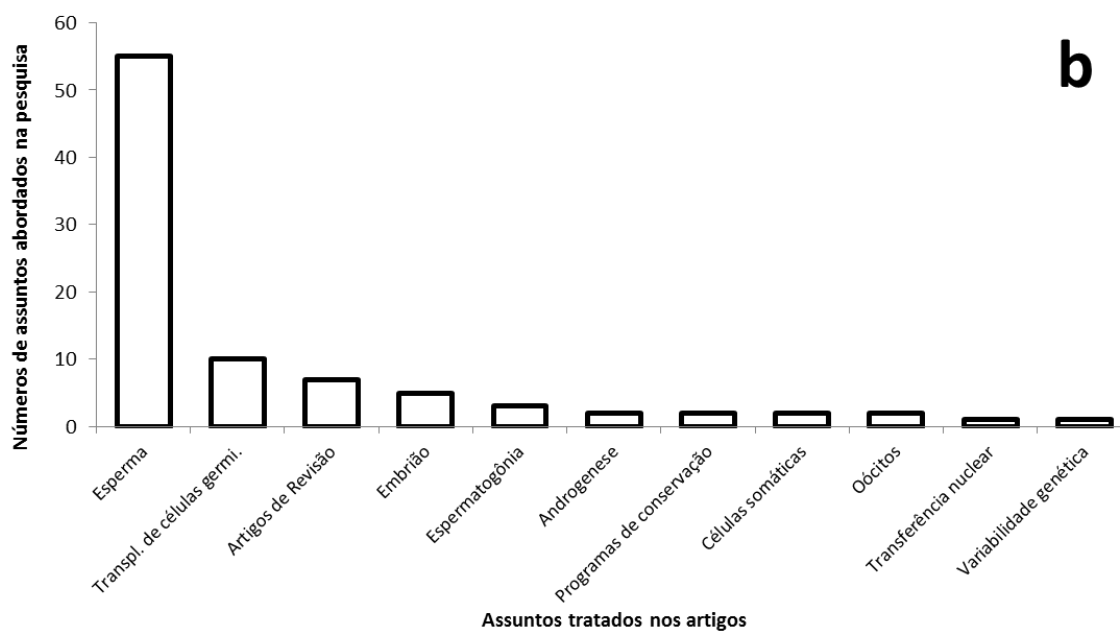
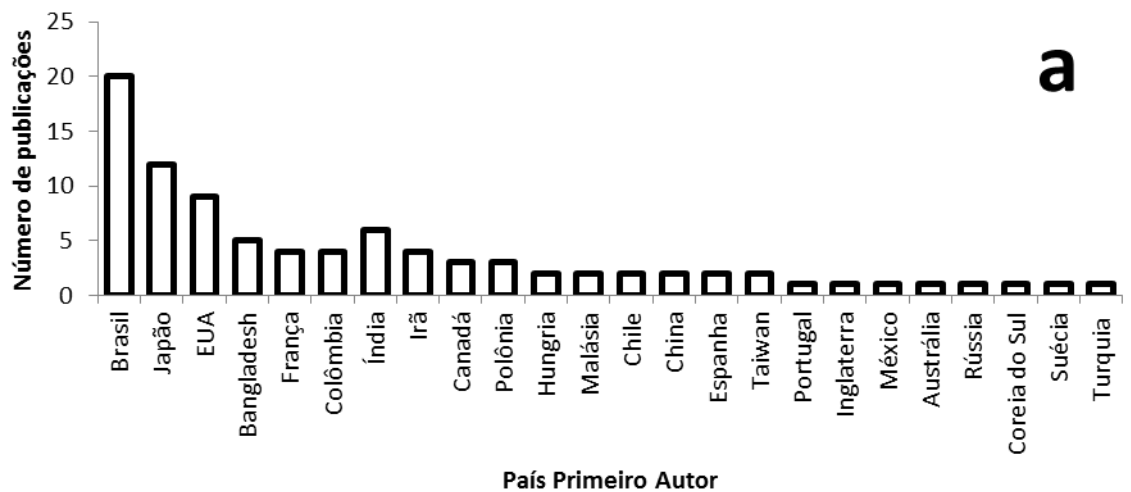


Fig. 4. Nacionalidade do primeiro autor (a) assuntos abordados nos artigos da pesquisa sobre o uso da criopreservação para a conservação da biodiversidade de peixes (b)

Tabela 1- Referências das publicações que criopreservaram o esperma de espécies ameaçadas com a respectiva categoria de ameaça e indicação das espécies não encontradas na ASFI (2017).

Espécies	CA	Referências	Espécies	CA	Referências
<u>Acipenseriformes</u>					
<i>Acipenser persicus</i>	CR	Abed-Elmdoust et al. (2015) Abed-Elmdoust et al. (2017)	* <i>Poecilia latipinna</i>	LC	Huang et al. (2009)
<i>Scaphirhynchus albus</i>	EN	Wayman et al. (2008)	* <i>Poecilia reticulata</i>	NE	Huang et al. (2009)
<u>Characiformes</u>					
<i>Brycon insignis</i>	EN*	Viveiros et al. (2011)	Xiphophorus couchianus	CR	Yang et al. (2009)
<i>Brycon siebenthalae</i>	NE	Cruz et al. (2004)	Xiphophorus helleri	NE	Yang et al. (2007)
<u>Gadiformes</u>					
<i>Brycon opalinus</i>	VU*	Orfão et al. (2011) Viveiros et al. (2012)	<i>Gadus morhua</i>	VU	Butts et al. (2011)
<i>Brycon orbignyanus</i>	EN*	Carolsfeld et al. (2003) Maria et al. (2006) Viveiros et al. (2008; 2010; 2015) Galo et al. (2011) Souza et al. (2014)	<i>Lota lota</i>	NE	Jensen et al. (2008)
<u>Perciformes</u>					
<i>Leporinus obtusidens</i>	LC	Viveiros et al. (2008)	<i>Anarhichas lupus</i>	DD	Le François et al. (2008)
<i>Prochilodus brevis</i>	NE	Nunes et al. (2016) Silva et al. (2017) Nascimento et al. (2017)	<i>Anarhichas minor</i>	NT	Le François et al. (2008)
<i>Prochilodus lineatus</i>	NE	Carolsfeld et al. (2003) Viveiros et al. (2008; 2015) Souza et al. (2014)	<i>Nandus nandus</i>	LC	Sarder et al. (2012)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	NE	Martínez et al. (2012) Martínez et al. (2013) Atencio et al. (2015)	<i>Maccullochella peelii</i>	CR	Daly et al. (2008)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	NE	Carolsfeld et al. (2003) Souza et al. (2014)	<i>Rhinogobius sp</i>	-	Yokoi et al. (2008)
<i>Hucho hucho</i>	EN	Aramli et al. (2014)	<u>Pleuronectiformes</u>		
<i>Salminus brasiliensis</i>	NE	Viveiros et al. (2009)	<i>Verasper variegatus</i>	NE	Tian et al. (2008)
* <i>Salminus maxilloso</i>	NE	Carolsfeld et al. (2003)	<u>Salmoniformes</u>		
<i>Leporinus elongatus</i>	NE	Carolsfeld et al. (2003)	<i>Coregonus lavaretus</i>	VU	Ciereszko et al. (2008)
<u>Cypriniforme</u>					
<i>Probarbus jullieni</i>	EN	Chew et al. (2010) ^a	<i>Hucho hucho</i>	EN	Nynca et al. (2015)
<i>Cyprinus carpio</i>	VU	Linhart et al. (2000)	<i>Thymallus thymallus</i>	LC	Horváth et al. (2012) Nynca et al. (2015)
<i>Labeo calbasu</i>	LC	Nahiduzzaman et al. (2012)	<i>Oncorhynchus formosanus</i>	CR	Gwoet al. (1999)
<i>Labeo rohita</i>	LC	Routray et al. (2006)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NE	Aguilar-Juarez (2014)
* <i>Ptychocheilus Lucius</i>	VU	Tiersch et al. (2004)	<i>Salmo trutta caspius</i>	LC	Rahimi et al. (2016)
* <i>Varicorhinus macrolepis</i>	LC	Ji et al. (2008)	<u>Siluriformes</u>		
<i>Tanakia limbata</i>	NE	Ohta et al. (2001)	<i>Ompok pabda</i>	NT	Sarder et al. (2013)
<i>Tork hudree</i>	EN	Basavaraja et al. (2004) Basavaraja et al. (2006) Patil et al. (2005), (2016)	<i>Silurus glanis</i>	LC	Linhart et al. (2005)
<i>Tor putitora</i>	EN	Patil et al. (2005)	* <i>Pseudoplatystom corruscans</i>	NE	Carolsfeld et al. (2003)
<i>Tor tambroides</i>	DD	Chew et al. (2010) ^b	<u>Synbranchiformes</u>		
<i>Tor douronensis</i>	NE	Chew et al. (2010) ^b	<i>Mastacembelus armatus</i>	LC	<u>Rahman et al. (2016)</u>
<i>Puntius sarana</i>	NE	Nahiduzzaman et al. (2011)			

*Espécies não encontradas na ASFI (2017). *MMA (2014), outras espécies IUCN, (2016). Categoria de ameaça (CA): criticamente em perigo (CR), em perigo (EN), quase ameaçada (NT), vulnerável (VU), pouco preocupante (LC), dados deficientes (DD), não avaliado (NE).

Normas da revista

Brazilian Journal of Biology

O Brazilian Journal of Biology publica resultados de pesquisa original em qualquer ramo das ciências biológicas. Estará sendo estimulada a publicação de trabalhos nas áreas de biologia celular, sistemática, ecologia (auto-ecologia e sinecologia) e biologia evolutiva, e que abordem problemas da região neotropical. A revista publica somente artigos em inglês. Artigos de revisões de temas gerais também serão publicados desde que previamente propostos e aprovados pela Comissão Editorial. Informações Gerais: Os originais deverão ser enviados à Comissão Editorial e estar de acordo com as Instruções aos Autores, trabalhos que não se enquadrem nesses moldes serão imediatamente devolvidos ao(s) autor(es) para reformulação. Os trabalhos que estejam de acordo com as Instruções aos Autores, serão enviados aos assessores científicos, indicados pela Comissão Editorial. Em cada caso, o parecer será transmitido anonimamente aos autores. Em caso de recomendação desfavorável por parte de um assessor, será usualmente pedida a opinião de um outro. Os trabalhos serão publicados na ordem de aceitação pela Comissão Editorial, e não de seu recebimento. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista.

Preparação de originais

O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais: Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas. O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

Nomes dos autores – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecedidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar e, y, and, et em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes.

Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustração e tabelas) devem ser submetidos através da interface de administração do sistema “Submission da SciELO” cujo endereço www.scielo.br/bjb (SUBMISSÃO - ONLINE).

Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre sumariar resultados e conclusões.

Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação:

1ª página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço.. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso).

2ª página e seguintes – Abstract (sem título); Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos.

Em separado - Tabelas e Figuras.

O trabalho deverá ter, no máximo, 25 páginas, incluindo tabelas e figuras, em caso de Notes and Comments limitar-se a 4 páginas.

A seriação dos itens de Introdução e Agradecimentos só se aplicam, obviamente, a trabalhos capazes de adotá-la. Os demais artigos (como os de Sistemática) devem ser redigidos de acordo com critérios geralmente aceitos na área.

Referências Bibliográficas:

1. Citação no texto: Use o nome e o ano de publicação: Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar and Rocha, 2000); Zaluar and Rocha (2000). Se houver mais de dois autores, usar “et al.”

2. Citações na lista de referências devem estar em conformidade com a norma ISO 690/2010.

No texto, será usado o sistema autor-ano para citações bibliográficas (estritamente o necessário), utilizando-se “and” no caso de 2 autores. As referências, digitadas em folha separada, devem constar em ordem alfabética. Nas referências de artigos de periódicos deverão conter nome(s) e iniciais do(s) autor(es), ano, título por extenso, nome da revista (por extenso e em itálico), volume, número, primeira e última páginas. Referências de livros e monografias deverão também incluir a editora e, conforme citação, referir o capítulo do livro. Deve(m) também ser referido(s) nome(s) do(s) organizador(es) da coletânea. Exemplos:

Livro:

LOMINADZE, D.G., 1981. Cyclotron waves in plasma. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

Capítulo de livro:

WRIGLEY, E.A., 1968. Parish registers and the historian. In: D. J. STEEL, ed. National index of parish registers. London: Society of Genealogists, pp. 15-167.

Artigo de periódico:

CYRINO, J.E. and MULVANEY, D.R., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line. Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology, vol. 59, no. 3, pp. 517-525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000300017>.

Dissertação ou tese:

LIMA, P.R.S., 2004. Dinâmica populacional da Serra Scomberomorus brasiliensis (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Trabalho apresentado em evento:

RANDALL, D.J., HUNG, C.Y. and POON, W.L., 2004. Response of aquatic vertebrates to hypoxia. In: Proceedings of the Eighth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality, October 12-14, Chongqing, China. Athens, Georgia, USA: EPA, 2006, pp. 1-10.

Referência disponível online:

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA, 2013 [viewed 4 February 2013]. Hidro Web: Sistema de Informações hidrológicas [online]. Available from: <http://hidroweb.ana.gov.br/>

A Revista publicará um Índice inteiramente em inglês, para uso das revistas internacionais de referência.

As provas serão enviadas aos autores para uma revisão final (restrita a erros e composição) e deverão ser devolvidas imediatamente. As provas que não forem devolvidas no tempo solicitado - 5 dias - terão sua publicação postergada para uma próxima oportunidade, dependendo de espaço.

Material Ilustrativo – Os autores deverão limitar as tabelas e as figuras (ambas numeradas em arábicos) ao estritamente necessário. No texto do manuscrito, o autor indicará os locais onde elas deverão ser intercaladas.

Tabelas - deverão ter seu próprio título e, em rodapé, as demais informações explicativas. Símbolos e abreviaturas devem ser definidos no texto principal e/ou legendas.

Na preparação do material ilustrativo e das tabelas, deve-se ter em mente o tamanho da página útil da REVISTA (22 cm x 15,0 cm); e a idéia de conservar o sentido vertical. Desenhos e fotografias exageradamente grandes poderão perder muito em nitidez quando forem reduzidos às dimensões da página útil. As pranchas deverão ter no máximo 30 cm de altura por 25 cm de largura e incluir barra(s) de calibração. As tabelas e figuras devem ser submetidas em arquivos separados.

As ilustrações devem ser agrupadas, sempre que possível.

CAPÍTULO 2

Manuscrito aceito para a revista “Aquaculture.”

Amides as cryoprotectants for the freezing of *Brycon orbignyianus* sperm

Carolina Trindade Perry^a, Carine Dahl Corcini^b, Andreia Nobre Ancuti^b, Marina Vianna Otte^b, Sara Lorandi Soares^c, Juan Ramon Esquivel Garcia^d, Juan Ramon Esquivel Muelbet^d, Antonio Sergio Varela Junior^{a,b,*}

^a Federal University of Rio Grande, Biology of Continental Aquatic Environments. Rio Grande, 9620– 900, Brazil.

^b Federal University of Pelotas, Veterinary Medicine. Capão do Leão, 96010900, Brazil.

^c Federal University of Pelotas , Biotechnology. Capão do Leão, 96010900, Brazil

^d University of Southern Santa Catarina, Agronomy. Palhoça, 88137272, Brazil.

* Corresponding author: Federal University of Rio Grande. Comparative Animal Reproduction. Rio Grande, 9620900, Brazil. e-mail addresses: varelajras@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of different amides as an alternative for the cryopreservation of sperm from the endangered species, *Brycon orbignyianus*, an important fish for aquaculture in Brazil. The cryoprotectants which were combined with Beltsville Thawing Solution™ extender, each at the concentrations of 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%, were as follows: (1) dimethylacetamide (DMA), (2) dimethylformamide (DMF), and (3) methylformamide (MF). The cryoprotectant methylglycol (MG, 10%) was used as a control group. Therefore, 13 treatment groups were performed. The sperm were diluted in each cryoprotectant, loaded into 0.25-mL straws, frozen in a nitrogen vapor vessel (dry shipper), and stored in liquid nitrogen at -196 °C. The following sperm-movement parameters were measured using CASA: total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear speed (VCL), rectilinear speed (VSL), average path velocity (VAP), curved line distance (DCL), straight line distance (DSL), average path distance (DAP), straightness (STR), linearity (LIN), wobble (WOB), cross beat frequency (BCF) and sperm movement duration (SMD). In order to assess DNA fragmentation index, lipid peroxidation, cell integrity, integrity of plasma membrane, membrane fluidity, mitochondrial functionality, and reactive oxygen species, flow

cytometry was used. The best results were obtained with 7.5% DMF, among all the amides tested, with sperm motility (66%) significantly higher than the other cryoprotectants evaluated ($P < 0.05$). DMF (7.5%) exhibited higher velocities and distances, and lower ROS production and lipoperoxidation, in comparison to MG ($P < 0.05$). It also exhibited high membrane integrity (84.5%) and cell integrity (98.7%), and low membrane fluidity (20.3%) ($P < 0.05$). MG (10%) exhibited only 38% motility, lower mitochondrial protection (39.8%), and higher DNA fragmentation index (0.07), despite the high membrane integrity observed (85.6%). The DMF concentration of 7.5% demonstrated greater protection of sperm function and cellular structure, and is therefore recommended for the cryopreservation of *B. orbignyamus*

Keywords: cryoprotectants, amides, conservation, *B. orbignyamus*, CASA, flow Cytometry

1. Introduction

Brazilian migratory fish are known as piracema fish. During the spawning season, these fish migrate upstream, in order to find clean water to spawn. Overfishing, changes in rivers, urbanization, and construction of dams are among the major causes for population decline in these species (Carosfeldet et al., 2003). Among these migratory fish is *B. orbignyamus* (Valenciennes, 1849) of Characiformes order, popularly known as piracanjuba. This species is found in the Paraná-Uruguay basin, mainly in Grande and Paraná rivers (Zaniboni-Filho et al., 2006). The species is threatened with extinction and is classified as an endangered species (MMA, 2014). Piracanjuba is a well-studied species with a great potential in aquaculture and is also used in the conservation programs in Brazil, including the repopulation programs (Lopera-Barrero et al., 2010). An important advantage of cryopreservation technique is that, in addition to being associated with long-term genotype conservation as a safeguard for endangered species, it is also necessary for conservation programs (Frase, 2008). The possibility of maintaining, manipulating, and managing the genetic variability in live gene banks and cryobanks is facilitated by the use of this technique (Cabrita et al., 2010; Horváth et al., 2012). This is mainly due to the possibility of genetic variability analysis of the biological materials, while a part is preserved for potential use (Fopp-Bayatet et al., 2012).

Until 2017, 10% methylglycol (MG) was recommended as the suitable cryoprotectant for freezing the sperm of endangered species, especially from genus *Brycon* (Maria et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Orfão et al., 2011). Although methylglycol together with dimethyl

sulfoxide are the most common cryoprotectants used for Characiformes order (Salmito-Vanderley et al., 2014), each species requires a specific protocol, as the diluents and cryoprotectants may exhibit different toxicities because the biochemical composition of the seminal plasma varies between the species (Holt, 2000a).

Another group of penetrating cryoprotectants includes amides, which have been investigated as an alternative to other types of cryoprotectants, with cell viability results post-thaw better than glycerol and DMSO, in bird species (Alvarenga et al., 2005), kangaroos (McClellan et al., 2008), and swine (Bianchi et al., 2008) and have been successfully tested for Characiformes, as well as for other fish species, (Babiak, 2008; Varela et al., 2012). Amides, may be useful as a cryoprotectant because of its low molecular weight and high cell permeability. Their lower molecular weights allow more easily and rapidly while entering and while specially leaving the cell more rapidly during sperm thawing, thus causing less osmotic stress (Pena et al., 2011). In this way the amides may be a more suitable cryoprotective for *B. orbignyana*, since it has not yet been tested for this species.

Although there are certain species of the native fish that already have a cryoprotectant established for their cryopreservation, there is nonetheless a requirement to aim for improved results. Another important factor that requires improvement in the cryopreservation research is the sperm quality analysis protocol. This can improve the understanding of the mechanisms through which sperm are affected and the factors that influence sperm quality (Cabrita et al., 2014). The analysis of structural levels of the membrane, mitochondria, and biochemical parameters that promote cell damage, such as the production of reactive species of oxygen (ROS) and lipoperoxidation (LPO), could contribute in controlling sperm quality during freezing.

The objective of this study was to perform a structural and functional evaluation of the sperm cells from *B. orbignyana* using the amides: dimethylformamide, methylformamide, and dimethylacetamine, each at the concentrations of 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%, using 10% methylglycol as a control.

Materials and methods

1.1. Sperm collection and post-thaw evaluation using CASA

All the reagents used in this experiment were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), unless mentioned otherwise. Fish (*B. orbignyana*) were supplied by Piscicultura Panamá in Paulo Lopes, Santa Catarina, Brazil. The collection was

performed in December at the peak of breeding season; therefore, no hormonal induction was necessary. Only animals weighing over 1 kg were used in our study. In order to prevent sperm activity due to the contact with water, urine, or excrement, the fish were dried with a cloth and the urogenital orifice was cleaned with a paper towel. Samples were collected using abdominal massage and the biological material was collected directly into sterile test tubes. Immediately after collection, the samples were analyzed under a phase-contrast microscope at 200x magnification (Olympus BX41, 400x).

Any sperm motility (auto-activation) observed was considered urine or water contamination, and the sample was discarded. In order to analyze the selected samples, 1 μ L of semen from each sample along with 99 μ L of distilled water was placed on a slide and observed under the microscope. Only samples containing at least 80% moving cells were used for further analysis. Sperm samples from 10 males were used for this experiment with each male representing one biological replicate ($n = 10$). Samples from each treatment was diluted at 1:10 ratio (sperm: extender with cryoprotectant), packaged into 0.25 mL straws, and frozen in a dry shipper (Taitson et al., 2008, Varela et al., 2012). The extender solution was the Beltsville Thawing Solution (BTS™), composed of 37 g glucose, 6 g sodium citrate dehydrate, 1.25 g sodium bicarbonate, 1.25 g ethylene diaminetetraacetate, and 0.9 g potassium chloride (Pursel and Jonhson, 1975). The 13 treatments were diluted in BTS™, which are: MF, DMF, and DMA, each at the concentrations of 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%, and MG at a concentration of 10% as control (Maria et al., 2006). The equilibration time was 15 min for MG (López et al., 2015) and 2 min for the amides (Varela et al., 2012) at room temperature. After a month, the straws were thawed in a water bath at 45°C for 10s (Varela et al., 2012) and post-thaw sperm quality was immediately estimated using the CASA system and flow cytometry. The thawed sperm was activated by using 5 μ L distilled water for 1 μ L of sperm, and the activity was recorded using Computer Assisted Semen Analysis (CASA). In order to perform this evaluation, 10 fields with at least a total of 100 cells were captured, and the activation was repeated 2 times up to 5 field captures. The parameters evaluated were total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear speed (VCL), rectilinear speed (VSL), average path velocity (VAP), curved line distance (DCL), straight line distance (DSL), average path distance (DAP), straightness (STR), linearity (LIN), wobble (WOB) and cross beat frequency (BCF). The sperm movement duration (SMD) after sperm activation was determined based on the time of complete arrest of the progressive movement of the spermatozoa (Sorensen, 1979).

2.2. Flow cytometry

Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems, Waltham, MA USA) was used in our study. The non-sperm cells were removed on the basis of FSC/SSC dispersion plots, and the debris was removed by staining the cells with Hoechst 33342 stain at a concentration of 16.2 μM , except while measuring DNA fragmentation index (Petrunikina et al., 2005). A total of 10,000 spermatozoa per sample of sperm were analyzed with a flow rate of 200 cells/s using Attune Cytometric Software V2.1.

2.2.1. Integrity of the plasma membrane (IPM)

Membrane integrity was verified by using fluorophores, SYBR-14 and propidium iodide (PI) (MiniTube, Tiefenbach, Germany). Sperm aliquots were homogenized and incubated at room temperature for 10 min with a fluorescent probe containing 0.25 mM of SYBR-14 and 7.5 μM of PI. The sperm cells were classified as not-damaged and functional membrane (SYBR+/PI-), and damaged and/or non-functional membrane (SYBR+/PI+; SYBR-/PI+; SYBR-/PI-). The rate was calculated from the number of not-damaged sperm cells with functional membrane/number of sperm cells positive for H 33342; this number was multiplied by 100 to express the percentage of spermatozoa for each category.

2.2.3. Mitochondrial functionality (MIT)

Rhodamine 123 (13 μM) and IP (7.3 μM) were used to assess the mitochondrial function according protocol previously described (Liu et al., 2015). Briefly, only intact sperm cells (IP-) were selected and classified into cells with high functionality (high fluorescence, high accumulation of Rhodamine) and cells with low functionality (low fluorescence, low accumulation of Rhodamine) (Liu et al., 2015).

2.2.4. DNA fragmentation index (DFI)

DNA fragmentation index was determined using the fluorescent probe acridine orange metachromatic and Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). In order to perform this evaluation, 5 μL aliquots of sperm, TNE [0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA; pH 7.2], and Triton [Triton X-100, 0.1% (v/v)] were mixed for 30 s. Acridine orange was added only at the moment of reading, which did not exceed the duration of 2 min after the addition of the probe. The solution was diluted in 500 μL PBS in order to obtain appropriate cytometer readings. The results were obtained using BL1 (green fluorescence) and BL3

detectors (red fluorescence), which equals red fluorescence / total (green+ red) fluorescence (Lewin et al., 1999).

2.2.5. Concentration of reactive oxygen species (ROS)

Concentration of ROS was determined using the fluorescent probe, we used the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, which emits green fluorescence when oxidized by intracellular ROS, at a final concentration of 1.0 μM , and IP at a final concentration of 7.3 μM . The median intensity of green fluorescence for only live sperm (IP-) was used (Domínguez-Rebolledo et al., 2011).

2.2.6. Lipid peroxidation (LPO)

Lipid peroxidation was determined using C11-BODIPY added to the sample at a final concentration of 1 μM (Hagedorn et al., 2012), incubated for 2 h at room temperature (20 °C); only the live spermatozoa were analyzed. Green fluorescence represented peroxidized lipid and red fluorescence represented no peroxidation of lipid. The lipid peroxidation rate of the sperm was calculated as: the median intensity of green fluorescence/ (mean green fluorescence intensity + mean red fluorescence intensity) \times 100.

2.2.7. Membrane Fluidity (FLU)

In order to evaluate Membrane Fluidity, we used 2.7 μM hydrophobic merocyanine 540 (M540) and 0.1 μM YO-PRO-1 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) with the sample for 5 min. High fluidity (high concentration of M540) and low fluidity (low concentration of M540) cells were evaluated only for intact spermatozoa (YO-PRO-1 negative) (Fernández-Gago et al., 2013). The membrane flow rate was calculated as: the number of spermatozoa with high fluidity/ (number of spermatozoa with low fluidity + spermatozoa with high fluidity) \times 100.

2.2.8. Cell integrity (CI)

We used propidium iodide (PI), which emits red fluorescence, at a concentration of 7.3 μM to verify cell integrity. The sperm were classified as non-disrupted (IP negative) and disrupted (IP positive). The cell integrity rate was calculated as: the number of spermatozoa non-disrupted/ (the number of spermatozoa disrupted + spermatozoa non- disrupted) \times 100.

2.3. Statistical analysis

In this study, all the variables were normally distributed according to Shapiro–Wilk test, and descriptive data (mean and standard error of the mean) were generated for each of the dependent variables: MT, SMD, PM, VCL, VSL, VAP, DCL, DSL, DAP, LIN, STR, WOB, BCF, mitochondrial functionality, reactive oxygen species, cell integrity, plasma membrane integrity, membrane fluidity, and DNA fragmentation index. The effects of the cryoprotectant combinations and concentrations on the responses were tested by two-way analyzed of variance ANOVA, and the means were analyzed using the LSD test. The Pearson's correlation coefficients using only the control treatment. Statistix® 2009 software was used for analysis.

3. Results

3.1. CASA and duration of motility period

The use of 7.5% DMF (Fig. 1A) presented the highest values for total and progressive motility in comparison to the other cryoprotectants with an improvement of 73.94% in total motility and 113.1% in progressive motility, in comparison to the control treatment of 10% MG ($P < 0.05$). The highest values for curvilinear velocity and curvilinear distance (Fig. 1B, 1C) were also observed with 7.5% DMF ($P < 0.05$), and these values demonstrated no differences when compared to those observed with 10% DMF ($P > 0.05$). The parameters of VSL, VAP, DSL, and DAP (Fig. 1B, 1C) also presented higher values with 7.5% DMF compared to the other treatments, with the exception of 5.0% and 10% DMF, for which no difference was observed ($P > 0.05$). The amide DMF 7.5% is among the highest values observed for STR, LIN, Wobble and BCF (Fig. 2A, 2B, 2C and 2D). The duration of sperm movement (SMD) did not demonstrate any differences (Fig. 3A) with DMF at the concentrations of 5.0% and 10%, and with DMA at the concentration of 5.0% ($P > 0.05$); whereas, in comparison to the other treatments, the DMF concentration of 7.5% exhibited higher values ($P < 0.05$).

3.2. Flow cytometry

The cryoprotectants that presented the highest mitochondrial protection (Fig. 3B) were DMA at the concentrations of 2.5%, 5.0%, and 10%, DMF at 2.5%, 7.5%, and 10%, and MF at all the concentrations tested ($P < 0.05$). MG presented the lowest mitochondrial protection value among all the cryoprotectants tested ($P < 0.05$). In the evaluation of cell integrity (Fig. 3C), less protection was observed with the use of 10% MG ($P < 0.05$), which demonstrated no

difference with 2.5% and 5.0% concentrations of MF ($P > 0.05$). The membrane integrity (Fig. 3D) was maintained in all the treatments, the lowest values were observed with 2.5% DMA and 2.5% MF ($P < 0.05$). Higher membrane fluidity (Fig. 3E) was observed with the use of 2.5% and 10% MF, and lower membrane fluidity was observed with the use of 5.0% MF, 5.0% and 7.5% DMA, 5.0%, 7.5%, and 10% DMF, and 10% MG ($P < 0.05$). There was a lower production of ROS (Fig. 3F) with the use of 7.5% and 10% DMF, 2.5%, 5.0%, and 10% DMA, and 7.5% MF ($P < 0.05$). The concentrations of 7.5% and 10% DMF demonstrated higher protection against lipoperoxidation (Fig. 3 G) when compared to 10% DMA, 2.5% DMF, 7.5% MF, and 10% MF ($P < 0.05$). In the fragmentation of DNA (Fig. 3H), while smaller values were observed with the use of amides, 10% MG exhibited a greater fragmentation compared to the other cryoprotectants ($P < 0.05$). Correlations among total motility, mitochondria, sperm move duration, lipid peroxidation, concentration of reactive oxygen species, and cell integrity are depicted (Fig. 4). The DNA fragmentation index demonstrated a negative correlation with the parameters: total motility, mitochondria and integrity of the plasma membrane ($P < 0.004$). Correlations were also observed between lipid peroxidation and concentration of reactive oxygen species ($P < 0.01$).

4. Discussion

This study is a pioneer in using amides for the cryopreservation of *B. orbignyana* sperm. Our results clearly demonstrate that the addition of DMF at a concentration of 7.5% in the BTS™ extender leads to better results in terms of motility, mitochondrial functionality, ROS generation, lipid peroxidation, and DNA fragmentation index, in comparison to the control treatment of 10% MG ($P < 0.05$). To date, 10% MG has been considered the best cryoprotectant for *B. orbignyana* sperm conservation as it was compared only with dimethyl sulfoxide and methanol (Maria et al., 2006). When 10% MG in BTS™ was used for the cryopreservation of *B. orbignyana* sperm in a previous study, 42% motility was observed (Viveiros et al., 2015); a value close to that obtained in our study. Amides are organic compounds derived from carboxylic acids by replacing the hydroxyl (-OH) with the amino (-NH₂) group, while glycols are any of a class of organic compounds belonging to the alcohol family in the molecule of a glycol, two hydroxyl (—OH) groups are attached to different carbon atoms. Both belong to the group of penetrating cryoprotectants, which act by means of their colligative properties, decreasing the intracellular freezing point, decreasing the intracellular concentration of solutes and creating a less harmful environment for sperm during freezing (Holt, 200b).

The advantages of its use must be associated with the benefits of the protective effect against its harmful toxic effect. In the evaluation of sperm kinetics, the use of the amide DMF at a concentration of 7.5% was observed to be more effective in the preservation of the movement, presenting better results for velocity and distance parameters compared to the other cryoprotectants. As with total (Urbányi et al., 2006; Liu et al., 2007; Espinoza et al., 2010; Dziewulska et al., 2011; Babiak et al., 2012; Varela et al., 2012; Kainin et al., 2014), and progressive motility (Maria et al., 2015; Gallego et al., 2017) the values for velocities, (Viveiros et al., 2010; Dziewulska et al., 2011; Babiak et al., 2012; Maria et al., 2015; Figueroa et al., 2016; Gallego et al., 2017) and linearity (Martínez et al., 2012) correlated with the rate of fertilization. The evaluation of these parameters in the sperm quality analysis is of great value as it renders the evaluation of the rate of fertilization and hatching unnecessary, thus avoiding the loss of female reproductive material and the difficulty encountered in that evaluation due to the variability in the quality of the eggs.

Regarding the mitochondrial functionality values, the only one that was inferior to the other treatments was the one observed with 10% MG ($P < 0.05$). It is recognized that cryopreservation causes damage to the cell structures and that there is a positive correlation between mitochondrial functionality and motility ($r = 0.20$; $P < 0.05$, Fig. 4), as there is a change in the biochemical process involved in the production of ATP, causing a reduction in sperm motility (Figueroa et al., 2017). Among all the concentrations of cryoprotectants tested, the 7.5% concentration of amide DMF exhibited a lower production of ROS and LPO. ROS production is one of the major causes of the deleterious effects of cryopreservation in sperm cells. The imbalance between the presence of ROS and sperm antioxidant activity is the main cause of cryogenic damages in sperm, while the specific cellular structure of spermatozoa, with little cytoplasm and low antioxidant power, makes these cells even more vulnerable to free radical damage (Bollwein et al., 2008).

Oxidative stress also produces lipid peroxidation ($r = 0.33$; $P < 0.05$, Fig. 4), which may cause irreparable damage to the plasma membrane, rendering the cell inactive. The plasma membrane is an important structure that could be damaged during cryopreservation (Segovia et al., 2000). It plays a fundamental role in the maintenance and establishment of cellular homeostasis (Hammerstedt et al., 1990). Most of the cryoprotectants exhibited membrane preservation greater than 80%, implying that the evaluation of plasma membrane integrity does not hold a paramount importance in choosing the most effective cryoprotectant, as no differences were observed between the following treatments: 7.5% and 10% DMA,

2.5%, 5.0%, and 7.5% DMF, 5.0%, 7.5%, and 10% MF, and 10% MG. Several cryoprotectants exhibited low membrane fluidity, indicating greater stability of the plasma membrane. The amides maintained the membrane structure better when compared to MG. Methylglycol did not exhibit the same protection against cellular disruption, as verified through the cellular integrity evaluation, where the value observed with MG was lower than those observed with most of the amides ($P < 0.05$), presenting no differences with the treatments 2.5% DMA and 5% MF ($P > 0.05$).

The DNA fragmentation index of the 10% MG treatment was higher than all the other treatments ($P < 0.05$). The DNA fragmentation is the most frequently observed anomaly in the infertile individuals (Tamburino et al., 2012). This induces the occurrence of DNA with structural imperfections between improperly paired nucleotides, at different levels of embryogenesis (Lewis and Simon, 2010), thus reducing the rate of fertilization and hatching in fish (Santos et al., 2013). Although the DNA has the capacity to repair itself when fragmentation occurs, the level of repair depends on the extent of damage as well as on the gamete quality (Tamburino et al., 2012). Therefore, the importance of maintaining the integrity of sperm DNA during cryopreservation is necessary to avoid fertilization failure (Devaux et al., 2010; Perez-Cerezales et al., 2010; Santos et al., 2013).

Among the amides tested in our study, DMA at concentration of 10% has been successfully used for research concerning cryopreservation of the fish Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). For species Medaka (*Oryzias latipes*) (Aokiet et al., 1997) and Characiformes Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Richardson et al., 2000; Varela et al., 2012), the best results for cell viability after thawing were with DMF at concentrations of 10 and 8% respectively when compared to DMSO. In a study involving Spotted halibut (*Verasper variegatus*), the amide DMF used at a concentration of 13% has been demonstrated to be less efficient than DMSO and propylene glycol (Tian et al., 2008). However, in case of amides, concentrations greater than 11% are not recommended, as it results in an increased toxic effect (Varela et al., 2012; Alvez et al., 2016).

Nevertheless, in order to protect the sperm of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), the amide DMA was used at a concentration of 10%, however, it did not exhibit significant differences with DMSO and methanol, when used without equilibration time as that reduces the efficiency of amides (Babiak et al., 2008). These facts confirm the need to test different cryoprotectants for different species due to the high specificity of the toxic effects of the cryoprotectants (Holt, 2000). Similar to the amides, MG is also a low molecular weight penetrating cryoprotectant and the advantages of its use must be associated

with the benefits of the protective effect against its harmful toxic effect. The use of DMF at 7.5% may improve at protocol for semen cryopreservation of endangered fish species (similar at *B. orbignyanus*).

Acknowledgements

We would like to thank the Foundation of support and protection of research of Rio Grande do Sul, FAPERGS for the financing. The researchers, Varela Jr and CD Corcini, thank Piscicultura Panamá, for the animals and facilities assigned and the team of the Comparative Animal Reproduction (RAC) for the support in collections and analysis. C.D. Corcini (Process no. 306356/2014-7) and A.S. Varela Junior (Process no. 307195/2015-7) are research fellows from the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Authors' contribution

Study conception and design: Perry; Corcini and Varela.

Acquisition of data: Perry; Ancuti; Otte; Soares; Garcia; Ramon

Analysis and interpretation of data: Perry; Corcini and Varela

Drafting of manuscript: Perry; Corcini and Varela

Critical revision: All authors

References

Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S.L., 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 105–113.

Alves, J.P., Corcini, C.D., Silva, E.F., Caldas, J.S., Cardoso, T.F., Piedras, S.R., Junior, A.S.V., 2016. The role of amides in seminal cryopreservation of wild silverside, *Odontesthes bonariensis*. *Cryobiology* 73, 383–387.

Aoki, K., Okamoto, M., Tatsumi, K., Ishikawa, Y., 1997. Cryopreservation of medaka spermatozoa. *Zool. Sci.* 4, 641–644.

Babiak, I., Bolla, S., Ottesen, O., 2008. Suitable methods for cryopreservation of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquac. Int.* 16, 561–572.

Babiak, I., Marschhäuser, V., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Eggen, B., Babiak, J., 2012. Effects of extender, storage and sperm-to-egg ratio on cryopreservation success of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 941–947.

Bianchi, I., Calderam, K., Maschio, É.F., Madeira, E.M., da Rosa Ulguim, R., Corcini, C. D., Bongalhardo, D.C., Lucia Jr., T., Deschamps, J.C., Corrêa, M.N., 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 69, 632–638.

Bollwein, H., Fuchs, I., Koess, C., 2008. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 189–195.

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez, P.S., Robles, V., Beirao, J., Pérez, C.S., Herráez, M.P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 623–635.

Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce D.G., Sarasquete C., Herráez, M.P., Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 432, 389–401.

Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni-Filho, E., Harvey, B.J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.* 63, 472–489.

Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S., 2011. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquat. Toxicol.* 101, 405–11.

Dziewulska, K., Rzemieniecki, A., Czerniawski, R., Domagała, J., 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology* 76, 300–311.

Domínguez-Rebolledo, A.E., Martínez-Pastor, F., Bisbal, A.F., Ros-Santaella, J.L., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A.J., Garde, J.J., Fernández-Santos, M.R., 2011. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide and importance of individual male variability. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 393–403.

Espinoza, C., Valdivia, M., Dupré, E., 2010. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38, 121–394 128.

Fernández-Gago, R., Domínguez, J.C., Martínez-Pastor, F., 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology* 80, 400–410.

- Figueroa, E., Valdebenito, I., Merino, O., Ubilla, A., Risopatrón, J., Farias, J.G., 2016. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmosalar* sperm: effects on sperm physiology. *J. Fish Biol.* 89, 1537-1550.
- Figueroa, E., Valdebenito, I., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Dumorné, K., Castillo, R. L., Farias, J.G., 2017. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Rev. Aquacult.* 9, 76–87.
- Fopp-Bayat, D., Andrzej, C., 2012. Microsatellite genotyping of cryopreserved spermatozoa for the improvement of whitefish semen cryobanking. *Cryobiology* 65, 196–201.
- Fraser, D.J., 2008. How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evolutionary Applications* 1, 535–586.
- Gallego, V., Cavalcante, S.S., Fujimoto, R.Y., Carneiro, P.C.F., Azevedo, H.C., Maria, A.N., 2017. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 87, 16–24.
- Hagedorn, M., McCarthy, M., Carter, V.L., Meyers, S.A., 2012. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Plos One* 7, e39397.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73–88.
- Holt, W.V., 2000a. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47–58.
- Holt, W. V., 2000b. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3-22.
- Horváth, Á., Jeseník, D., Csorbai, B., Bokor, Z., Rabóczki, É., Kaczkó, D., Snoj, A., 2012. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 358, 213–215.
- Kainin, S., Ponchunchoovong, S., Imsilp, U., Singsee, S., 2014. Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880 spermatozoa. *Aquacult. Res.* 45, 859–867.
- Lewin, L.M., Golan, R., Freidlin, P., Shochat L., 1999. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry, *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 124, 133–137.
- Lewis, S.E., Simon, L., 2010. Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum. Fertil* 13, 201–207.

Liu, Q.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Ding, F.H., De Yu, D., Xu, X.Z., 2007. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 263, 20-25.

Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D., Xiao, Z., Xiao, Y., Li, J., 2015. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red sea bream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 413–422.

Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Mangolin, C. A., 2010. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 184–191.

Maria, A.N., Viveiros, T.M Freitas, R.T.F., Oliveira, A.V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260, 298–306.

Maria, A.N., Carvalho, A.C.M., Araújo, R.V., Santos, J.P., Carneiro, P.C.F., Azevedo, H.C., 2015. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology* 70, 109-114.

Martínez, J.G., Tarazona-Morales, A.M., Pardo-Carrasco, S.C., 2012. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. *Anim. Reprod.* 1, 1-8.

McClellan, R., Zee, Y.P., Holt, W.V, Johnston, S.D., 2008. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 57, 304–307.

MMA, 2014. Lista Oficial das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção e Sobreexplorados ou Ameaçados de Sobreexploração. Available at: http://scientific.thomsonreuters.com/imgblast/JCR_FullCovlist_-2016.pdf (accessed on 1 December, 2016).

Oliveira, A.V., Viveiros, A.T.M., Maria, A.N., Freitas, R.T.F., Izaú, Z.A., 2007. Success of cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 1509–1515.

Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Cosson, J., Viveiros, A.T.M., 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* 311, 241–247.

Pena, F.J., García, B.M., Samper, J.C., Aparicio, I.M., Tapia, J.A., Ferrusola, C.O., 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76, 1177-1186.

Perez-Cerezales, S., Martinez-Paramo, S., Beirao, J., Herraiez, M.P., 2010. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction* 139, 989-97

Petrunkina, A.M., Volker, G., Weitze, K.F., Beyerbach, M.E., Töpfen-Petersen, D. Waberski, 2005. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* 63, 2278-2299.

Pursel, V.G., Johnson L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99-102.

Richardson, G.F., Miller, T.I., McNiven, M.A., 2000. Cryopreservation of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult. Res.* 31, 307-315.

Salmito-Vanderley, C.S.B Pinheiro, J.P.S., Almeida, P.S., Lopes, J.T., Leite, L.V., 2014. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes characiformes. *Acta.Vet. Brasilica* 8, 343-350.

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Porcher, J.M., Bony, S., Sanchez, W., 2013 Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback, *Reprod.Toxicol.* 36, 6-11.

Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., Tiersch, T.R., 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* 53, 1489-1499.

Sorensen, A.M., 1979. Laboratory for animal reproduction, fourth ed. McGraw-Hill, New York.

Tamburrino, L., Marchiani, S., Montoya, M., Marino, F.E., Natali, I., Cambi, M., Forti, G., Baldi, E., Muratori, M., 2012. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian.J.Androl.* 14, 24-31.

Tian, Y.S., Chen, S.L., Ji, X.S., Zhai, J.M., Sun, L.J., Chen, C., Su, P.Z., 2008. Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. *Aquaculture* 284, 268-271.

Urbányi, B., Szabó, T., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Vranovics, K., Horváth, Á., 2006. Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 201-204.

Varela, J. A.S., Corcini, C.D., Gheller, S.M.M., Jardim, R.D., Lucia J.T., Streit J.D.P., Figueiredo, M.R.C., 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 78, 244–507 251.

Viveiros, A.T.M., Nascimento, A.F., Orfão, L.H., Isaú, Z.A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 74, 551–556.

Viveiros, A.T., Nascimento, A.F., Leal, M.C., Gonçalves, A.C., Orfão, L.H., Cosson, J., 2015. 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 Physiol. Biochem.* 41, 193–201.

Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M., 2006. Potencialidad del género *Brycon* em la piscicultura brasileña. *Rev. Col. Cien. Pec.* 19, 233–240.

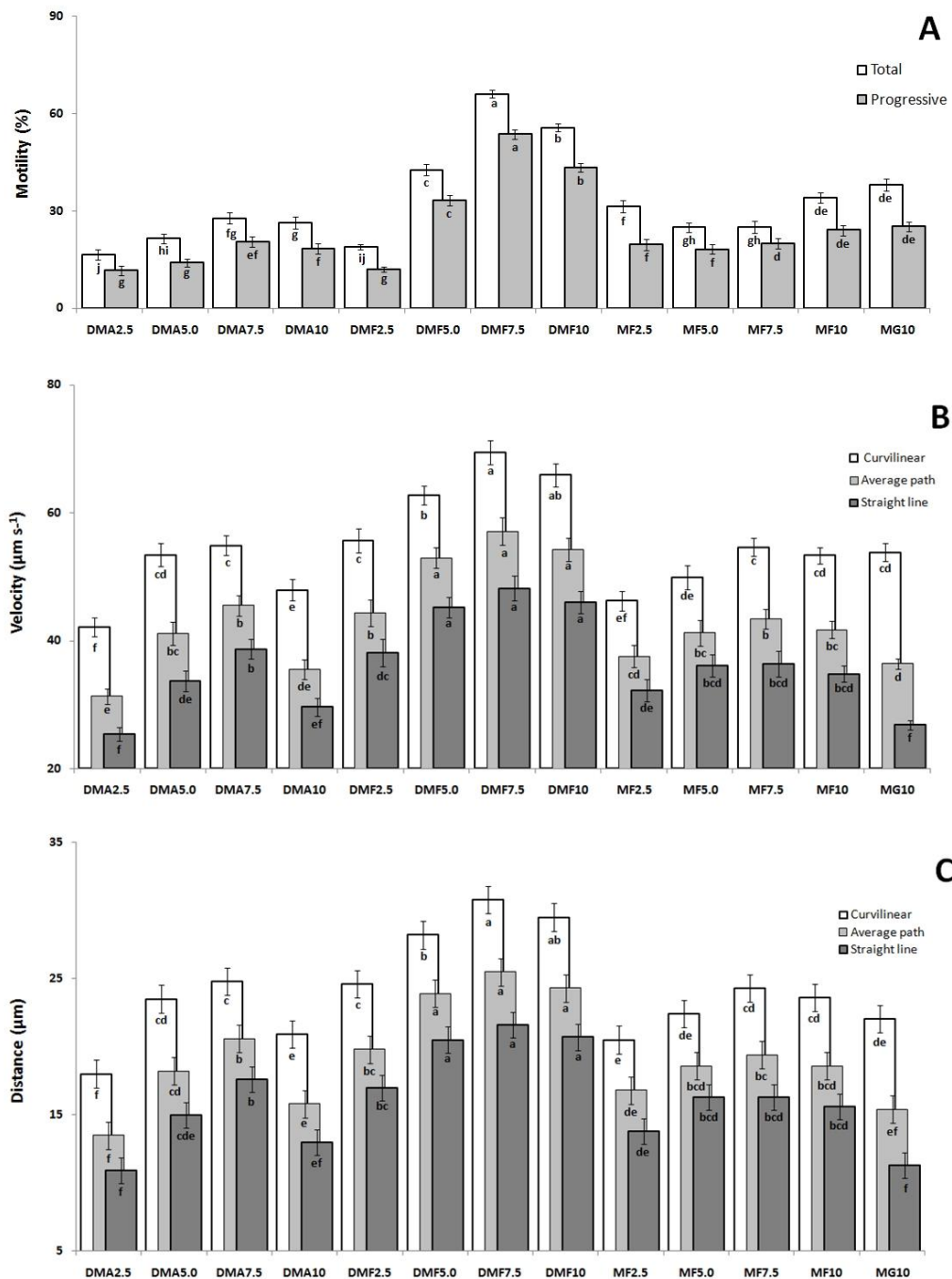


Fig. 1. Post thaw evaluation of spermatic kinetics: total and progressive motility (A), curvilinear, straight-line and average path velocities (B), curvilinear, straight-line and average path distances (C) for all cryoprotectants and concentrations (%) diluted in BTSTM with *B. orbignyamus* sperm. Dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF), methylformamide (MF) and methyglycol (MG). Means (\pm standard error) with different superscripts are significantly different, n = 10 males, P<0.05.

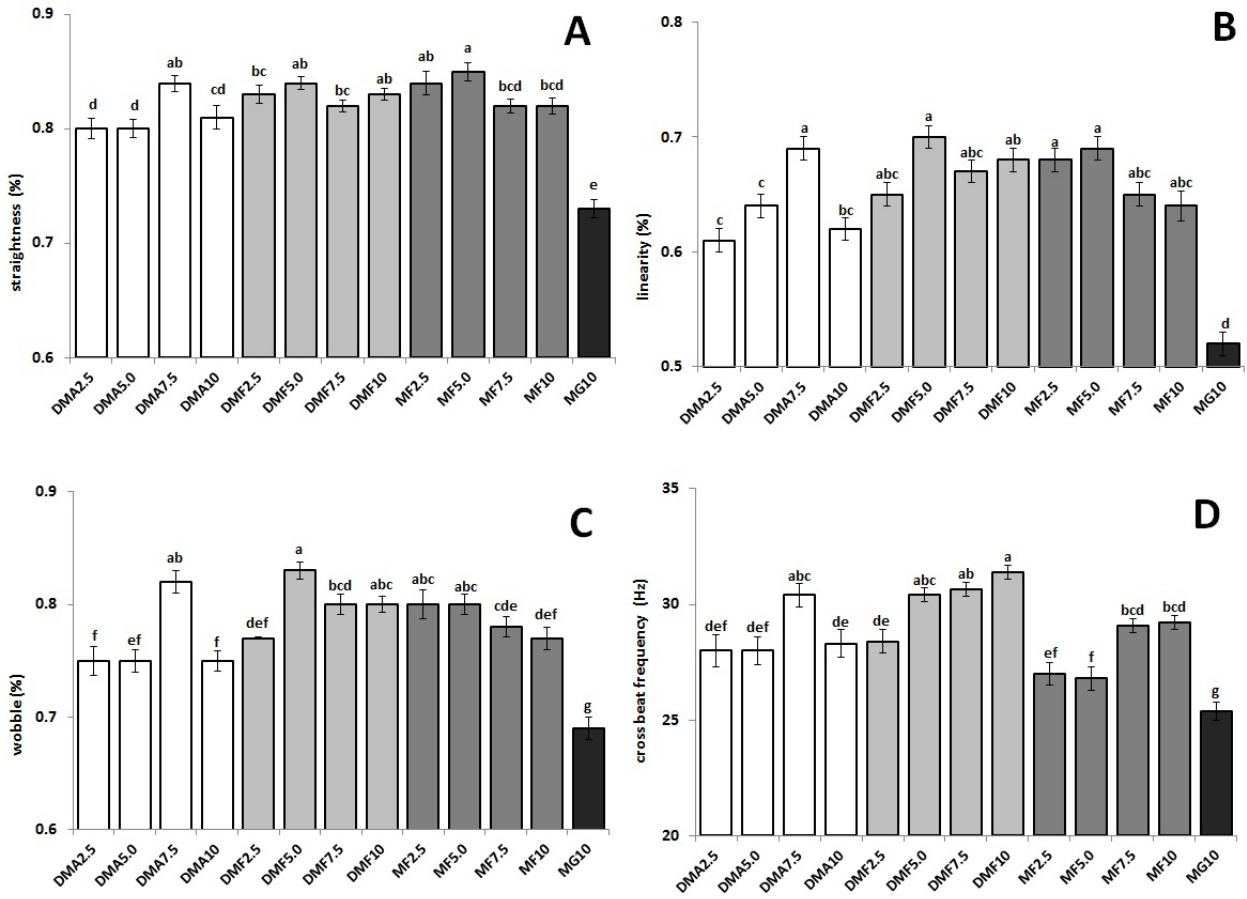


Fig. 2. Post thaw evaluation of spermatic kinetics: straightness (A), linearity (B), wobble (C) and beat cross frequency (D) for all cryoprotectants and concentrations (%) diluted in BTS™ with *B. orbignyamus* sperm. Dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF), methylformamide (MF) and methyglycol (MG). Means (± standard error) with different superscripts are significantly different, n = 10 males, P<0.05.

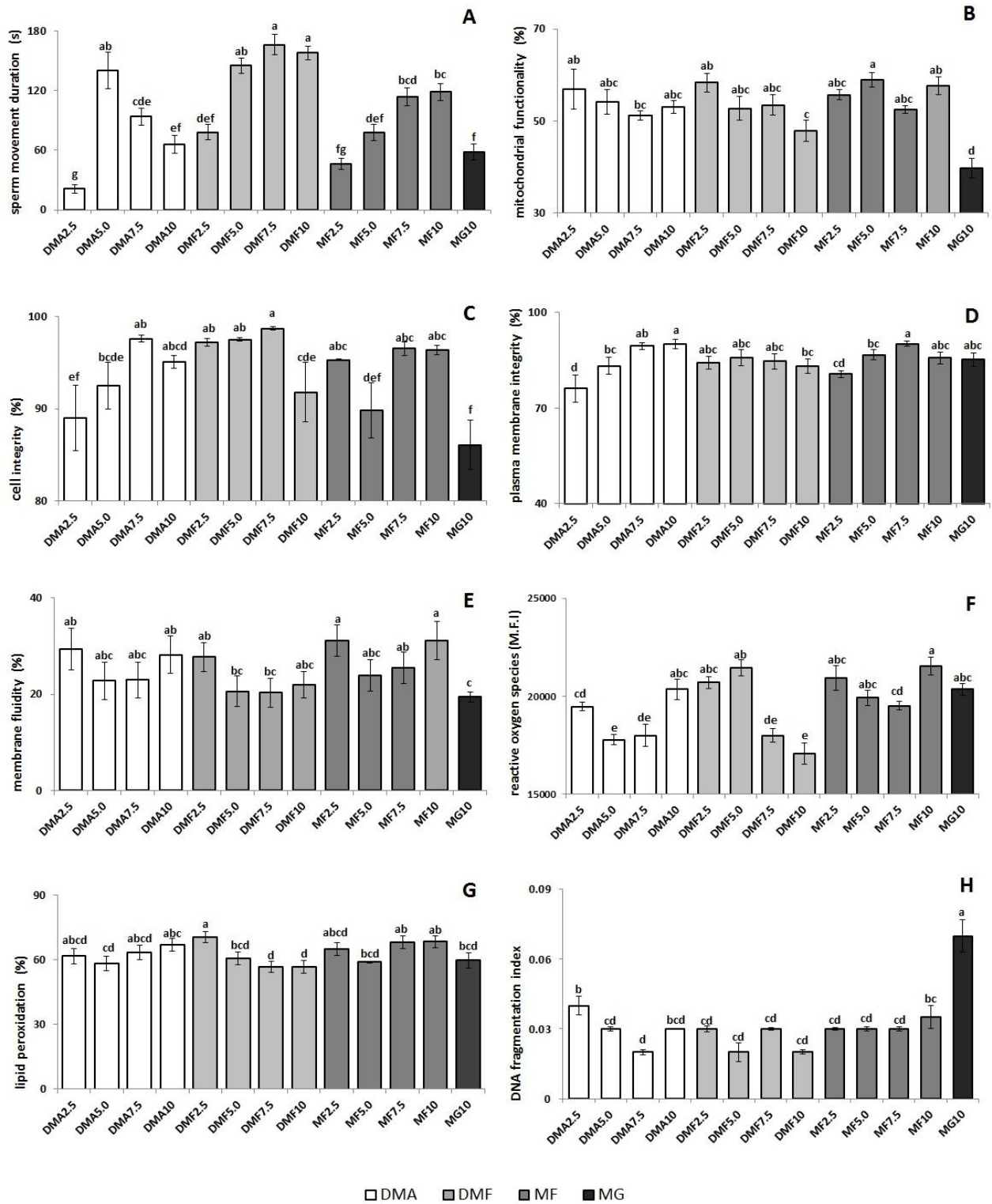


Fig. 3. Post thaw evaluation of sperm movement duration (A), mitochondrial functionality (B), cell integrity (C), plasma membrane integrity (D), membrane fluidity (E), concentration of reactive oxygen species (F), lipid peroxidation (G) and DNA fragmentation index (H) for all cryoprotectants and concentrations (%) diluted in BTS™ with *B. orbignyamus* sperm. Dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF), methylformamide (MF) and methyglycol (MG). Means (\pm standard error) with different superscripts are significantly different, $n = 10$ males, $P < 0.05$.

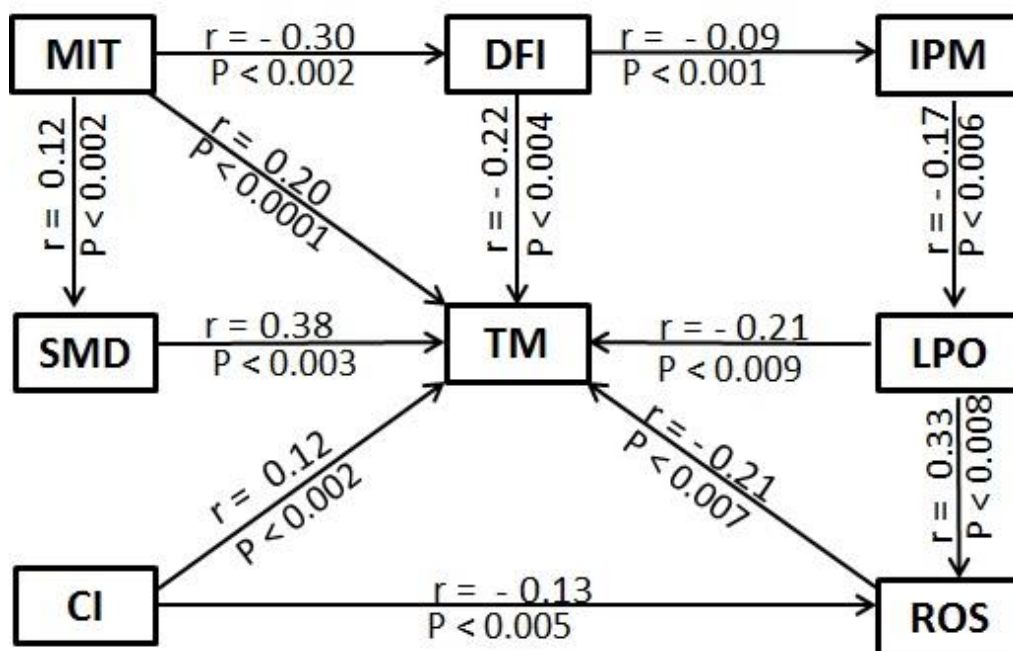


Fig.4. Significant Pearson's correlation ($P < 0.01$), between parameters of postthaw quality of *B. orbignyamus* sperm. Mitochondrial functionality (MIT), lipid peroxidation (LPO), concentration of reactive oxygen species (ROS), plasma membrane integrity (IPM), cell integrity (CI), DNA fragmentation index (DFI), total motility (TM), sperm movement duration (SMD).

GUIDE FOR AUTHORS Aquaculture

Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere. Articles are expected to contribute new information (e.g. novel methods of analysis with added new insights and impacts) to the knowledge base in the field, not just to confirm previously published work.

Review Articles can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential. Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques. The Letters to the Editor section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Contact details for submission Papers for consideration should be submitted via the electronic submission system mentioned below to the appropriate Section Editor:

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

AUTHOR INFORMATION PACK 1 Dec 2018 www.elsevier.com/locate/aquaculture 7

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

In order to facilitate the review process, please make sure your submission is prepared with:

- Double line spacing
- Numbered pages

BEFORE YOU BEGIN

Use of inclusive language Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no

assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration;

Resources;

Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

CAPÍTULO 3

Manuscrito submetido para a revista “Aquaculture Internacional”

The effect of raffinose, trehalose, sucrose, and lactose on the cryopreservation of *Brycon orbignyamus* sperm

Carolina Trindade Perry¹ Carine Dahl Corcini² Izani Bonel Acosta² Stela Mari Meneghello Gheller²

Camila Ribeiro Carvalho Brito ²Juan Ramon Esquivel Garcia³ Juan Ramon Esquivel Muelbert³

Antonio Sergio Varela Junior^{1,2}

1 Federal University of Rio Grande, Biology of Continental Aquatic Environments. Rio Grande, 9620–7900, Brazil.

e-mail: varelajras@gmail.com phone:055 53 32935186.

2 Federal University of Pelotas, Veterinary Medicine. Capão do Leão, 96010900, Brazil.

3 University of Southern Santa Catarina, Palhoça, 88137272, Brazil.

Abbreviations

DAP: Average path distance

VAP: Average Path Velocity

CASA: Computer Assisted Sperm Analysis

CD: Cell Disruption

ROS: Concentration of reactive oxygen species

DCL: Curved Line Distance

VCL: Curvilinear Speed

DMF: Dimethylformamide

DFI: DNA fragmentation index

FLU: Membrane Fluidity

LAC: Lactose

LPO: Lipoperoxidation

MIT: Mitochondrial Functionality

IPM: Plasma Membrane Integrity

PM: Progressive Motility

RAF: Raffinose

VSL: Rectilinear Speed

DSL: Straight line distance

SUC: Sucrose

TM: Total Motility

TRE: Trehalose

Abstract The objective of this study was to evaluate the use of saccharides for the cryopreservation of sperm of the endangered species *Brycon orbignyanus*. The non-permeating cryoprotectants used were lactose, sucrose, trehalose, and raffinose each at the concentrations of 50 mM, 100 mM, 150 mM, and 200 mM along with Beltsville Thawing Solution™ extender and 7.5% dimethylformamide as permeating cryoprotectant. The sperm were diluted in each cryoprotectant, loaded into 0.25-mL straws, frozen in a nitrogen vapor vessel (dry shipper), and stored in liquid nitrogen at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. The following sperm-movement parameters were measured using CASA: total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear speed (VCL), rectilinear speed (VSL), average path velocity (VAP), curved line distance (DCL), straight line distance (DSL), average path distance (DAP), straightness (STR), linearity (LIN), wobble (WOB), and cross beat frequency (BCF). In order to assess DNA fragmentation index, lipid peroxidation, cell disruption, integrity of plasma membrane, membrane fluidity, mitochondrial functionality, and reactive oxygen species, flow cytometry was used. The saccharides did not improve sperm kinetics after thawing. However, beside the kinetic outcomes, raffinose at 50 mM prevented ROS production, membrane fluidity, cell disruption, and fragmentation of DNA ($P < 0.05$). The results indicate that raffinose has the potential to preserve *B. orbignyanus*.

Keywords: cryopreservation, membrane fluidity, saccharides, *B. orbignyanus*

Introduction

The Piracanjuba, *B. orbignyanus*, (Valenciennes, 1849) belonging to Characiformes order, is a Brazilian migratory species with great potential for aquaculture. In the natural environment, it is threatened principally by the construction of dams, environmental deterioration, and fishing (Carosfeld et al. 2003) and has been categorized as endangered (MMA 2014). The benefits of using the cryopreservation technique in aquaculture and to conserve the species are well known. In aquaculture practices, cryopreservation facilitates artificial breeding in captivity (Cabrita et al. 2010), while in the conservation of endangered species, the use of the technique offers cryopreserved sperm banks that may be of particular importance to guarantee genetic diversity in captive breeding programs and allow the reproductive success of population management strategies (Carosfeld et al. 2003; Viveiros et al. 2009). However, cryopreservation is detrimental to sperm quality, affecting organelles such as mitochondria (Figuroa et al. 2007), DNA (Pérez-Cerezales et al. 2010) and plasma membrane (Martínez-Páramo et al. 2012). Although for several species of fish, cryopreserved sperm are already available, there is still a need to improve the outcome to ensure maximum efficiency in cryopreservation and to reduce cryodamage, especially when it comes to the formation of germplasm banks with the aim of conserving endangered species. This improvement can be achieved by supplementing non-permeating cryoprotectants such as saccharides to improve sperm quality in the seminal extender together with a permeating cryoprotectant.

Saccharides play an important role during the cryopreservation of biological materials, not only due to their osmotic effects on cell dehydration, reducing the formation of ice crystals and cryoinjury to the cellular organelles, but also stabilize the membrane lipid bilayer in spermatozoa. Sugars can prevent structural and substructural damage to the spermatozoa by interacting with the polar groups of the phospholipids (Crowe et al. 1984; De Leeuwet et al. 1993). Disaccharides are more efficient in stabilizing the membrane than monosaccharides (Strauss et al. 1986; Anchordoguy et al. 1987) as well as in increasing osmotic dehydration (Salamon 1968; Koshimoto and Mazur 2002). In the case of cryopreservation of fish, the most commonly used saccharides in diluents include the monosaccharide, glucose (Bozkurt et al. 2005; Martínez et al. 2012; Horváth et al. 2015) and the

disaccharide, sucrose, made of by the condensation of fructose and glucose (Mounib 1978; Holtz et al. 1991; Boryshpolets et al. 2011). Other saccharides, such as trehalose, lactose, and raffinose, have not been explored in detail for fish species. Trehalose is a naturally occurring non-toxic disaccharide found in bacteria, fungi, plants, and invertebrates; it has been shown to provide cellular protection during water-limited conditions (Alpert 2005). It showed better results than sucrose for Boer goat with improved membrane motility and integrity (Naing et al. 2010), increased motility for birds (Blanco et al. 2011) and for Zandi ram where improvement was observed in motility and membrane functionality (Najafi et al. 2013). It showed good results, in terms of motility, for kelp grouper, *Epinephelus moara* (Miyaki et al. 2005), rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Judycka et al. 2016) and White fish, *Coregonus lavaretus*, where motility did not differentiate from that offered by sucrose (Nynca et al. 2016).

Lactose is a disaccharide whose monosaccharide composition differs from sucrose and trehalose. It improves sperm motility in cryopreservation of pigs (Gómez-Fernández et al. 2012), buffalos (Eriani et al. 2017) and other mammals (Keeley et al. 2012). In sturgeons such as *Acipenser sinensis* and *Acipenser dabryanus*, it also improves motility when combined with trehalose (Xi et al. 2018), while in the case of *B. orbignyanus*, the use of lactose in Beltsville Thawing Solution™ (BTS™) with DMSO or methanol could not preserve motility more than 30% (Felizardo et al. 2016). Raffinose, a naturally occurring trisaccharide in many plants (Van den Ende and Valluru 2008), has been used as a cryoprotectant mainly for sperm from rats (Nakagata et al. 1992; Nakagata et al. 2000; Sztejn et al. 2001), while in other mammals, it decreased sperm abnormalities in Moghani ram (Jafaroghli et al. 2011) and increased motility in Merino ram (Bucak et al. 2013). There have already been a few studies on its effect in fish species; in some recent studies, it was used as a part of a new extender that was found to be more effective in terms of fertilization and motility than diluents containing trehalose or sucrose for *Danio rerio* cryopreservation (Matthews et al. 2018) and also promoted motility in Characiformes, pacu, *Piaractus mesopotamicus* sperm (Pires et al. 2018). This study aimed to evaluate the application of saccharides in the post-thawing sperm quality of *B. orbignyanus*.

Materials and methods

Fish handling and sperm collection

The sperm of fish *B. orbignyanus* (0.5 ± 1.0 kg) were collected at the farm Pisciculture Panamá located in Paulo Lopes, Santa Catarina, Brazil ($27^{\circ} 57'37.8''$ S and $48^{\circ} 45'29.0''$ W). The collection was performed during December 2017 at the peak of the breeding season; therefore, no hormonal induction was necessary. The urogenital papilla was cleaned and dried with a paper towel and sperm were collected in a 15-mL conical tube through abdominal massage, with avoiding simultaneous extrusion of feces and urine to prevent milt contamination and sperm activation. Sperm collection was carried out at room temperature ($\sim 27^{\circ}\text{C}$) and tubes containing sperm were placed in a cooler ($9\text{--}10^{\circ}\text{C}$). Immediately after the collection, visual parameters of sperm motility were monitored using 1 mL of semen and 99 mL of distilled water (27°C) mounted on a slide and analyzed under a phase contrast microscope (BX Olympus 41, 400x) at 200x magnification. The same technician analyzed all the samples. Only samples containing at least 80% moving cells were used.

Sperm cryopreservation

Sperm samples from 10 males were used for this experiment with each male representing one biological replicate ($n = 10$). The extender solution was Beltsville Thawing Solution (BTSTTM), composed of 37 g glucose, 6 g sodium citrate dehydrate, 1.25 g sodium bicarbonate, 1.25 g ethylene diaminetetraacetate, and 0.9 g potassium chloride (Pursel and Jonhson 1975). The treatments diluted in BTSTTM included following compositions: 7.5% dimethylformamide (DMF) as a control (Perry et al. 2019) and other treatments were DMF 7.5% as permeating cryoprotectant supplemented with non-permeating cryoprotectants at the concentrations of 50 mM, 100 mM, 150 mM, and 200 mM of each of lactose, sucrose, raffinose, and trehalose (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA). In total, 17 treatments, four non-penetrating cryoprotectants at four concentrations and one control, all diluted in BTSTTM with DMF 7.5% were used. There was no equilibrium time and all cryoprotectants were maintained in a cooler ($9\text{--}10^{\circ}\text{C}$) during the freezing step. The samples from each treatment were diluted at 1:10 ratio (sperm: extender with cryoprotectant). After dilution, the samples were

homogenized, packed in 250 μ L containers and closed with polyvinyl alcohol. The samples were then placed in aluminum racks; subsequently, the samples were placed in a dry shipper of nitrogen vapor (Taylor-Wharton, model CP 300 dry shipper) for 12 h before being transferred to a liquid nitrogen canister (MVE TM, VOLTA 34, GA, USA) maintained at -196 °C, where samples were stored for at least 30 days (Varela Junior et al., 2012). After a month, the straws were thawed in a water bath at 45 °C for 10 s (Varela et al. 2012) and post-thaw sperm quality was immediately estimated using the CASA system and flow cytometry.

CASA evaluation

The thawed sperm were activated by using 5 μ L distilled water for 1 μ L of sperm, and the activity was recorded using Computer Assisted Semen Analysis (CASA). In order to perform this evaluation, 10 fields with at least a total of 100 cells were captured, and the activation was repeated 2 times up to 5 field captures. The parameters evaluated were total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear speed (VCL), rectilinear speed (VSL), average path velocity (VAP), curved line distance (DCL), straight line distance (DSL), average path distance (DAP), straightness (STR), linearity (LIN), wobble (WOB), and cross beat frequency (BCF).

Flow cytometry evaluation

Attune Acoustic Focusing[®] (Life Technologies) was used for flow cytometric analysis using blue (Argon 488 nm) and violet (UV 405 nm) lasers. In order to detect the sperm population, non-sperm cells were removed following the FSC \times SSC scatter plots (Petrunikina et al. 2005) and the debris was eliminated by staining the cells with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA) at a concentration of 16.2 μ M, except for the samples to be used to measure the DNA fragmentation index. In order to monitor the parameters, all cells were stained with fluorophores and added with calcium free PBS (80 g NaCl, 11.5 g KCl, 24 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ in 1 L deionized water). A total of 10,000 events per sperm sample with a flow of 200 cells/s were analyzed using the Cytometric Attune Software V2.1 program.

The integrity of the plasma membrane (IPM) and Cell Disruption (CD)

The membrane integrity was verified by using fluorophores SYBR-14 and propidium iodide (PI) (MiniTube, Tiefenbach, Germany). Sperm aliquots were homogenized and incubated at room temperature for 10 min with a fluorescent probe containing 0.25 mM of SYBR-14 and 7.5 μ M of PI. The sperm cells were classified as not-damaged and functional membrane (SYBR+/PI-), and damaged and/or non-functional membrane (SYBR+/PI+; SYBR-/PI+; SYBR-/PI-). The rate was calculated from the number of not-damaged sperm cells with the functional membrane/number of sperm cells positive for H33342; this number was multiplied by 100 to express the percentage of spermatozoa for each category (Figuroa et al. 2015). In order to verify the percentage of cellular rupture, the cells that were IP- were classified as non-ruptured whereas those that were IP+ were regarded as ruptured. The cell disruption rate was calculated as – the number of spermatozoa disrupted / (the number of spermatozoa disrupted + the number of spermatozoa non-disrupted) \times 100.

The concentration of reactive oxygen species (ROS)

The concentration of ROS was determined using the fluorescent probe dye 2,7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA), which emits green fluorescence when oxidized by intracellular ROS, at a final concentration of 1.0 μ M, and IP at a final concentration of 7.3 μ M. The median intensity of green fluorescence for only live sperm (IP-) was used (Domínguez-Rebolledo et al. 2011).

Mitochondrial functionality (MIT)

Rhodamine 123 (13 μ M) and IP (7.3 μ M) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA) were used to assess the mitochondrial function according to the protocol previously described (Liu et al., 2015). Only intact sperm (IP-) were selected and classified into cells with high functionality (high fluorescence, high accumulation of rhodamine) and cells with low functionality (low fluorescence, low accumulation of rhodamine). The mitochondrial functionality rate was calculated by the following formula: [(number of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential) / (high sperm count

potential of mitochondrial membrane + spermatozoa with low mitochondrial membrane potential]] × 100.

Lipid peroxidation (LPO)

Lipid peroxidation was determined using C11-BODIPY (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA), which was added to the sample at a final concentration of 1 μM. The samples were then incubated at room temperature (20 °C) for 2 h and only the live spermatozoa were analyzed. Green fluorescence represented peroxidized lipid and red fluorescence represented no peroxidation of lipid. The lipid peroxidation rate of the sperm was calculated as – the median intensity of green fluorescence / (mean green fluorescence intensity + mean red fluorescence intensity) × 100 (Hagedorn et al. 2012).

Membrane Fluidity (FLU)

In order to evaluate Membrane Fluidity, we used 2.7 μM hydrophobic merocyanine 540 (M540) and 0.1 μM YO-PRO-1 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) with the sample for 5 min. High fluidity (high concentration of M540) and low fluidity (low concentration of M540) cells that were stained with YO-PRO were classified as dead sperm and were not used in the calculation (Fernández-Gago et al. 2013). The membrane fluidity rate was calculated as the number of spermatozoa with high fluidity / (number of spermatozoa with low fluidity + spermatozoa with high fluidity) × 100.

DNA fragmentation index (DFI)

DNA fragmentation index was determined using the fluorescent probe acridine orange metachromatic and Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). In order to perform this evaluation, 5 μL aliquot of sperm, TNE (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA; pH 7.2) and Triton [Triton X-100, 0.1% (v/v)] were mixed for 30 s. Acridine orange was added only at the moment of reading, which did not exceed the duration of 2 min after the addition of the probe. The samples were read using BL1 (green fluorescence) and BL3 detectors (red fluorescence). DFI corresponds to red fluorescence / total (green+ red) fluorescence (Lewin et al. 1999).

Statistical analysis

All the variables were normally distributed according to the Shapiro-Wilk test, and descriptive data (mean and standard error mean) were generated for each of the dependent variables: MT, PM, VCL, VSL, VAP, DCL, DSL, DAP, LIN, STR, WOB, BCF, mitochondrial functionality, reactive oxygen species, cell disruption, plasma membrane integrity, membrane fluidity, and DNA fragmentation index. The effects of the saccharides concentrations on the responses were tested against control analyzed by ANOVA, and the means were analyzed using the LSD test. The associations between the variable responses and saccharide concentrations were determined by Pearson's correlation coefficients. Statistix® 2009 software was used for analysis.

Results

Post-thaw sperm quality CASA

The saccharides added to BTS™ with DMF 7.5% did not improve post-thaw sperm kinetics in *B. orbignyana* cells in relation to the control. Among the saccharides tested, the concentration of 50 mM raffinose was the only one that showed no difference ($P > 0.05$) compared to the control in terms of total and progressive motility, velocities (Table 1), and distances (Table 2) as well as LIN (Table 1), STR, BCF, and WOB (Table 2). The 50 mM sucrose concentration, although not differing ($P > 0.05$) from the control in motilities, showed lowest velocities (Table 1) and distances (Table 2) ($P < 0.05$). Both lactose and trehalose caused losses in motilities, velocities, and distances in all evaluated concentrations ($P < 0.05$). There was no difference in some parameters like VAP, LIN (Table 1), DAP, BCF, and WOB (Table 2) between 50 mM trehalose and the control ($P > 0.05$), while lactose was shown to be less effective for other kinetic parameters, STR, BCF (Table 1), and WOB (Table 2) at all concentrations ($P < 0.05$). Motility, velocity (Table 1), and distances (Table 2) were negatively affected by 100 mM, 150 mM, and 200 mM concentrations for saccharides used ($P < 0.05$). The values of LIN (Table 1) STR, BCF, and WOB (Table 2) were also mostly affected by the increase in saccharide concentrations with some exceptions, where the parameters of LIN, STR, and WOB were

not affected by 100 and 150 mM concentrations of raffinose ($P > 0.05$). The increase in the concentrations of each saccharide showed a dose dependent increase in the parameters of sperm kinetics; this can be verified through the negative correlations ($P < 0.01$) observed in Table 4.

Post-thaw sperm quality flow cytometer

The flow cytometric evaluation showed that the different saccharides with different concentrations affected sperm cells (Table 3). The ROS production was lower with all concentrations of raffinose and higher with 100 mM sucrose ($P < 0.05$). Lower cellular disruption was observed at 50 mM concentration of raffinose, trehalose, and sucrose ($P < 0.05$). Increased cell disruption was observed for all saccharides at 200 mM ($P < 0.05$). No differences in the membrane integrity were observed for most cryoprotectants ($P > 0.05$) except for raffinose and trehalose at 200 mM. The membrane fluidity was also affected by the saccharides, as raffinose, sucrose, and trehalose presented lower fluidity at 50 mM. Trehalose presented a higher fluidity ($P < 0.05$) at 200 mM and higher DNA fragmentation at 150 and 200 mM ($P < 0.05$). Lower fragmentation was observed with the use of 50 mM and 100 mM raffinose ($P < 0.05$). Mitochondrial functionality was not much affected by the saccharides; only 50 mM lactose and 100 mM sucrose resulted in lower mitochondrial functionality compared to the control ($P < 0.05$). Fluidity (Table 4) showed a positive correlation only with lactose and trehalose ($P < 0.01$), while cell disruption (Table 4) showed a positive correlation with all saccharides ($P < 0.01$). On the other hand, membrane integrity was found to be negatively correlated for raffinose, trehalose, and sucrose ($P < 0.01$).

Discussion

This is the first study that has evaluated the use of trehalose, raffinose, lactose, and sucrose in the spermatic cryopreservation of *B. orbignyana*. The addition of saccharides did not improve spermatic kinetics in relation to the control. Further, raffinose at 50 mM did not affect kinetic parameter but decreased the production of ROS, membrane fluidity, cell rupture, and fragmentation of DNA ($P < 0.05$).

The analyzed saccharides showed distinct cryoprotective effects. However, it has been reported that the effectiveness of saccharides depends on the molecular weight of sugar (Anchordoguyet et al. 1987; Molinia et al. 1994), saccharide type and composition (Browne et al. 2002; Gómez-Fernández et al. 2012), and the type of buffer used in the extender (Garcia et al. 1989; Abdelhakeam et al. 1991; Garde et al. 2008). In terms of motility, while comparing the most efficient concentrations (50 mM) of each saccharide, we observed that only raffinose and sucrose maintained motility, whereas trehalose and lactose were less effective in improving this parameter. If the aforementioned hypothesis is correct, the sugars with the same molecular weight should have a similar cryoprotective effect, which did not occur in the case of lactose and trehalose. Both these sugars were less effective than the control in improving the kinetic parameters of sperm quality but lactose was also the only saccharide that did not improve the fluidity and prevent the cellular disruption at 50 mM concentration. The difference in cryoprotectant effectivity between trehalose and lactose has also been verified in other studies (Gutiérrez-Pérez et al. 2009; Malo et al. 2010). Browne et al. (2002) suggested that trehalose is more effective than sucrose because of the higher ratio of –OH to C, suggesting that the action of disaccharides in the stabilization of membranes is due to the electrostatic bonding of OH-saccharide groups with phosphates in the lipid membranes, thus depending on the monosaccharide composition certain saccharides would be more effective than others in cell protection. In our study, this hypothesis could not be confirmed because sucrose preserved motility better than trehalose regardless of the ratio of –OH to C.

The combination of the cryoprotectant with an extender, not only considering the type of buffer, but also the composition and osmolarity, may be more decisive than factors such as molecular weight and saccharide composition (An et al. 2000; Jafaroghli et al. 2011; Judycka et al. 2016; Matthews et al. 2018), thus 50 mM raffinose, which did not promote motility in our study, may work well in combination of other types of extender. Another important factor in the choice of saccharides is the species-specific interaction since the biochemical composition of the seminal plasma varies widely among the different species due to the different concentrations of lipids, sugars, and acids responsible for sperm cell metabolism (Holt 2000). Therefore, each species can find a certain concentration of a

certain saccharide (Browne et al. 2002; Garde et al. 2008; Malo et al. 2010) or a combination of them (Naing et al. 2010; Blanco et al. 2011; Xi et al. 2018) more suitable than others. This interaction between the cryoprotectant and membrane may show the same behavior for other species of the same genus (Huang et al. 2009). This was found to be true in case of *P. mesopotamicus* and *B. orbignyana* belonging to the order Characiformes where both obtained good results with the use of raffinose in freezing. In the case of *P. mesopotamicus*, improvements in motility values were observed with the use of raffinose (50 and 100 mM) rather than other saccharides tested (Pires et al. 2018).

Saccharides are known to preserve membrane properties by interacting with the polar groups of phospholipids, preventing lateral spacing, membrane fluidity, and rupture, and reducing the temperature where transition occurs in the phases of lipid membranes. Thus by preventing or retarding the transition phase, the extravasation of cellular components and the fusion of the membranes can be prevented (Crowe et al. 1984; De Leeuw et al. 1993). One of the effects of cryopreservation is the destabilization of proteins and lipids that cause changes in fluidity, the preservation of lipid interactions and those between lipids and proteins is fundamental for the maintenance of the general function of sperm since each of them plays a very specific role in fertilization (Parks and Graham 1992). The used saccharides (at 50 mM concentration) were able to preserve the membrane fluidity in order to maintain lipid and protein interactions and impede lateral spacing. In the same condition, the cellular disruption was also prevented, which further reduced the extravasation of components guaranteeing better cellular preservation than without saccharides. As the concentration of the saccharides increased there was an increase in fluidity, further destabilizing the membrane lipids and proteins, increasing the spacing between them and thus causing greater cellular disruption at the higher concentrations of the treatments.

Raffinose being a nature component of plants causes effect that are related to indirect sugar signaling, triggering the production of ROS-specific scavengers (Van den Ende and Valluru 2008). In our study, 50 mM raffinose showed lower ROS production and decreased fragmentation rate of DNA in relation to the control. The imbalance between ROS accumulation and their clearance by the antioxidant activity in spermatozoa is the main cause of cryogenic damage. The oxidative stress

besides producing lipoperoxidation, which is damaging mainly to the membranes (Bollwein et al. 2008), can also induce DNA damage (Rajeshet al. 2002; Bollwein et al. 2008). Tuncer et al. (2010) also observed lower DNA damage and higher antioxidant activities with the use of raffinose in frozen semen of the mammal Angora buck, *Capra hircusancryrensis*, but also observed no improvement in spermatic kinetics. The protection of DNA damage with the use of raffinose was also observed for Merino ram (Buacket al. 2013) and mice (Sariözkan et al. 2012), and also fewer sperm abnormalities were observed in Moghani ram (Jafaroghli et al. 2011). The integrity of sperm DNA is vital for sperm function since it is essential during embryogenesis (Lewis and Simon 2010) and fragmented DNA reduces the rate of fertilization and hatching in fish (Santos et al. 2013). The integrity of sperm DNA is an important marker of sperm function since it is essential to transmit genetic information. In this way, it acts as a parameter of paramount importance of viability and motility (Love et al. 2005; Ibrahim et al. 2008; Bucak et al. 2010).

In summary, raffinose at 50 mM maintained sperm kinetic parameters and reduced ROS production, cell disruption, membrane fluidity, and DNA fragmentation. Therefore, we suggest that it could be used with BTSTM and 7.5% DMF to cryopreserve the *B. orbignyana* cells.

Acknowledgments

We thank Piscicultura Panamá for the animals and facilities offered and the team of the Comparative Animal Reproduction (RAC) for their support in collections and analysis. We would also like to thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, DF, Brazil) for the postgraduate scholarships awarded to I.B. Acosta, S.M. M. Gheller; CNPq as well as the scholarships to the researchers Antonio Sergio Varela Junior (307195/2015–7) and Carine Dahl Corcini (306356/2014–7).

References

Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM (1991) Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 28:43–49

- Alpert P (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol* 45 (5):685–695
- An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Sakurai T, Kasai M (2000) Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology* 40:237–249
- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH (1987) Modes of interaction of crioprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 34: 324–331
- Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM (2011) Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 123:242–248.
- Bollwein H, Fuchs I, Koess C (2008) Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 43:189–195
- Boryshpolets S, Dzyuba B, Rodina M, Alavi SMH, Gela D, Linhart O (2011) Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants. *J Appl Ichthyol* 27 (5):1147–1149
- Bozkurt Y, Akcay E, Tekin N, Secer S (2005) Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Isr J Aquacult Bamidgeh* 57:125–130
- Browne RK, Clulow J, Mahony M (2002) The effect of saccharides on the post-thaw recovery of cane toad (*Bufo marinus*) spermatozoa. *Cryo Letters* 23:121–128
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S (2010) Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology* 61:248–253
- Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu MC, Bilgili A, Öztürk C, Kurçunlu AN (2013) Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 67 (1):34–39
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirao J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP (2010) Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* 26 (5): 623–635

- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol* 63:472–489
- Crowe LM, Mouradian R, Crowe JH, Jackson SA, Womersley C (1984) Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim Biophys Acta* 779:141–150
- De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ (1993) Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32–44
- Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella, JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR (2011) Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim* 46:393–403
- Eriani K, Sari N, Ihdina M, Rosnizar R (2017) The effect of equilibration time on semen freezing of local swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) with combination extender of lactose and glycerol. *Nus Biosci* 9 (1):77–82
- Felizardo VO, Melo CCV, Murgas LDS, Andrade ES, Navarro RD, Freitas TF (2016) Optimization of Artificial Propagation in Piracanjuba Fish *Brycon Orbignyanus* Using Cryopreserved Semen. *CryoLetters* 37 (5):330–334
- Fernández-Gago R, Domínguez JC, Martínez-Pastor F (2013) Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology* 80:400–410
- Figuroa E, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Sánchez R, Effer B, Isachenko E, Farias JG, Valdebenito I (2015) Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83:238–245
- Figuroa E, Valdebenito I, Zepeda AB, Figuroa CA, Dumorné K, Castillo RL, Farias JG (2017) Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Rev Aquacult* 9 (1):76–87
- Garcia MA, Graham EF (1989) Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugars and sugar alcohols on post- thaw motility. *Theriogenology* 31:1029–1037

- Garde JJ, Del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (2008) Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Anim Reprod Sci* 108:384–401
- Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, Mocé E, de Mercado E (2012) Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 133:109–116
- Gutierrez PO, Juarez MDE, Carvajal SU, Ortega ME (2009) Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58:287–292
- Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, Meyers SA (2012) Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Plos One* 7:e39397
- Holt WV (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47–58
- Holtz W, Schmidt-Baulain R, Meiners-Gefken M (1991) A simple saccharide extender for cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. 4th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish; Norwich, pp. 250–252
- Horváth Á, Labbé C, Jeseník D, Bernáth G, Kaczkó D, Bokor Z, Urbányi B (2015) Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *J Appl Ichthyol* 31:119–124
- Huang C, Sun C, Su X, Zhao X, Miao M, Liu Y, Dong Q (2009) Sperm cryopreservation in guppies and black mollies a generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. *Cryobiology* 59:351–356
- Ibrahim SF, Osman K, Das S, Othman AM, Majid NA, Abdul Rahman MPA (2008) A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics* 63 (30):545–550
- Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ (2011) The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Rumin Res* 96 (1):58–63
- Judycka S, Cejko BI, Dryl K, Dobosz S, Grudniewska J, Kowalski RK (2016) The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. *Aquaculture* 465:303–310

- Keeley T, McGreevy PD, O'Brien JK (2012) Cryopreservation of epididymal sperm collected postmortem in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Theriogenology* 78:315–325
- Koshimoto C, Mazur P (2002) The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology* 45: 80–90
- Lewin LM, Golan R, Freidlin P, Shochat L (1999) A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comp Biochem Physiol Part A* 124:133–137
- Lewis SE, Simon L (2010) Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum Fertil* 13:201–207
- Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Ding FH, De Yu D, Xu XZ (2007) Use of computer- assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 263:20–25
- Liu Q, Wang X, Wang W, Zhang X, Xu S, Ma D, Xiao Z, Xiao Y, Li J (2015) Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane cryopreservation. *Fish Physiol Biochem* 41:413–422
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD (2005) Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63:1584–1591
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I, Espinosa E (2010) Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* 61:17–21
- Martínez JG, García VA, Carrasco SP (2012) DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi: Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. *Neotrop Ichthyol* 10 (3):577–586
- Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Herráez MP, Sarasquete C, Cabrita E (2012). Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology* 77 (6):1129–1136
- Matthews JL, Murphy JM, Carmichael C, Yang H, Tiersch T, Westerfield M, Varga ZM (2018) Changes to Extender, Cryoprotective Medium, and In Vitro Fertilization Improve Zebrafish Sperm Cryopreservation. *Zebrafish* 15 (3):279–290
- Miyaki K, Nakano S, Ohta H, Kurokura H (2005) Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. *Fisheries SCI* 71 (2):457–458

MMA (2014) Lista Oficial das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes
http://scientific.thomsonreuters.com/imgblast/JCR_FullCovlist_2016.pdf. Cited 01 Dec 2016

Molinia FC, Evans G, Maxwell WM (1994) In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 34:491–500

Mounib MS (1978) Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 53:13–18.

Naing SW, Wahid H, Azam KM, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, San MM (2010) Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 122 (1–2):23–28

Najafi AM, Zhandi A, Sharafi AS, Khodaei M (2013) Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Criobiology* 66:275–282

Nakagata N, Takeshima T (1992) High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology* 37:1283–1291

Nakagata N (2000) Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm Genome* 11:572–576.

Nynca J, Judycka S, Liszewska E, Dobosz S, Grudniewska J, Arai K, Ciereszko A (2016) Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species. *Aquaculture* 464:340–348.

Parks JE, Graham J K (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209–222

Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez MP (2010) Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* 74:282–289

Perry CP, Corcini CD, Anciuti AN, Otte MV, Soares SL, Esquivel JR, Muelbet RE, Varela AS (2019) Amides as cryoprotectants for the freezing of *Brycon orbignyanus* sperm. *Aquaculture*

Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyerbach, ME, Töpfen-Petersen D, Waberski (2005) Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* 63:2278–2299.

- Pires DM, Corcini CD, Silva ACD, Gheller SMM, Pereira FA, Pereira JR Garcia JRE, Muelbert JRE, Varela Jr AS (2018) Association Between DMSO and Sugars in the Sperm Cryopreservation of Pacu. *CryoLetters* 39 (2):121–130.
- Pursel VG, Johnson LA (1975) Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40:99–102.
- Rajesh KT, Doreswamy K, Shrilatha B, Muralidhara M (2002) Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutat Res* 513:103–111.
- Salamon S (1968) Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Aust J Biol Sci* 21:355–360.
- Santos R, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Porcher JM, Bony S, Sanchez W (2013) Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reprod Toxicol* 36:6–11.
- Sarıözkan S, Bucak MN, Canturk F, Özdamar S, Yay A, Tuncer PB, Özcan S, Sorgucu N, Caner Y (2012) The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 C. *Cryobiology* 65 (2):93–97.
- Strauss G, Schurtenberger P, Hauser H (1986) The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 858 (1):169–180.
- Storey BT, Noiles EE, Thompson KA (1998) Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37 (1): 46–58.
- Sztejn JM, Noble K, Farley J S, Mobraaten LE (2001) Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 42 (1):28–39.
- Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Çiğerci ĞH, Büyükleblebici O (2010) The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology* 61 (1):89–93.
- Van den Ende W, Valluru R (2008) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *J Exp Bot* 60 (1):9–18.

Varela AJ, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia Jr T, Streit Jr DP, Figueiredo MRC (2012) Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 78 (2):244–251.

Viveiros AT, Orfão LH, Maria AN, Allaman IB (2009) A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim Reprod Sci* 112:293–300.

Xi MD, Li P, Du H, Qiao XM, Liu ZG, Wei QW (2018) Disaccharide combinations and the expression of enolase3 and plasma membrane Ca²⁺ ATP ase isoform in sturgeon sperm cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 53 (2):472–483.

Table 1 Post thaw evaluation of sperm kinetics: total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear (VCL), straight-line (VSL), average path (VAP), and velocities and linearity (LIN) for all saccharides at different concentrations with *B. orbignyamus* sperm (n = 10 males).

Treatment	TM (%)	PM (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)
Control	44.1 ±1.7	33.7 ±1.8	64.7 ±1.3	45.6 ±1.3	51.8 ±1.4	0.66 ±0.013
LAC 50 mM	26.1 ±1.8*	18.6 ±1.5*	48.0 ±1.6*	30.5 ±1.88*	37.4 ±2.2*	0.54 ±0.024*
LAC 100 mM	23.4 ±1.9*	17.4 ±1.7*	40.9 ±2.3*	28.6 ±2.5*	33.1 ±2.8*	0.53 ±0.029*
LAC 150 mM	21.2 ±1.4*	14.9 ±1.2*	47.9 ±2.03*	31.4 ±2.2*	37.2 ±2.6*	0.50 ±0.027*
LAC 200 mM	9.8 ±1.0*	6.9 ±0.9*	29.2 ±1.9*	19.5 ±2.1*	23.1 ±2.6*	0.43 ±0.032*
RAF 50 mM	41.8 ±1.5	34.5 ±1.4	59.4 ±1.3	42.7 ±1.3	47.9 ±1.3	0.65 ±0.010
RAF 100 mM	27.0 ±1.9*	20.0 ±1.7*	53.1 ±4.3*	38.6 ±4.3*	44.9 ±4.4*	0.61 ±0.026
RAF 150 mM	17.5 ±1.2*	12.6 ±1.0*	49.0 ±1.8*	34.4 ±1.9*	39.4 ±2.0*	0.65 ±0.020
RAF 200 mM	20.6 ±1.9*	15.7 ±1.7*	47.2 ±2.6*	33.8 ±2.8*	38.0 ±3.1*	0.56 ±0.029
SUC 50 mM	40.1 ±2.0	30.3 ±1.9	53.0 ±1.6*	33.0 ±1.9*	39.8 ±2.2*	0.58 ±0.018*
SUC 100 mM	20.9 ±1.7*	14.7 ±1.4*	49.0 ±3.7*	35.7 ±3.7*	40.7 ±3.8*	0.57 ±0.028*
SUC 150 mM	13.0 ±1.4*	8.1 ±0.9*	33.6 ±2.8*	23.5 ±2.9*	27.2 ±3.2*	0.50 ±0.031*
SUC 200 mM	10.3 ±1.0*	7.0 ±0.9*	35.2 ±1.7*	23.6 ±1.9*	28.0 ±2.4*	0.42 ±0.032*
TRE 50 mM	37.2 ±1.8*	26.3 ±1.7*	57.6 ±2.2*	38.8 ±2.3*	46.0 ±2.5	0.59 ±0.022
TRE 100 mM	23.8 ±2.0*	18.2 ±1.8*	45.5 ±1.8*	29.5 ±2.2*	35.7 ±2.4*	0.56 ±0.024*
TRE 150 mM	9.5 ±0.9*	6.7 ±0.8*	30.9 ±1.6*	21.3 ±1.9*	24.3 ±2.2*	0.45 ±0.030*
TRE 200 mM	8.4 ±1.0*	5.1 ±0.7*	25.2 ±1.8*	17.0 ±2.0*	20.1 ±2.4*	0.44 ±0.037*

Lactose (LAC), raffinose (RAF), sucrose (SUC), trehalose (TRE). *Means are significantly different from the control, mean (± standard error), P < 0.05.

Table 2 Post thaw evaluation of sperm kinetics: curved line, (DCL) straight line, (DSL) average path (DAP) distances, straightness (STR), beat cross frequency (BCF), and wobble (WOB) for all saccharides at different concentration with *B. orbignyamus* sperm (n = 10 males).

Treatment	DCL (µm)	DSL (µm)	DAP (µm)	STR (%)	BCF (Hz)	WOB (%)
Control	29.5 ±1.1	20.7 ±1.2	23.5 ±1.2	0.8 ±0.01	31.2 ±0.46	0.8 ±0.010
LAC 50 mM	21.9 ±1.0*	14.1 ±0.8*	17.0 ±0.9*	0.7 ±0.0*	25.7 ±1.13*	0.6 ±0.024*
LAC 100 mM	21.6 ±1.2*	13.1 ±1.0*	16.9 ±1.1*	0.6 ±0.03*	21.8 ±1.30*	0.6 ±0.032*
LAC 150 mM	18.8 ±1.3*	14.3 ±1.0*	15.2 ±1.1*	0.7 ±0.03*	23.9 ±1.28*	0.6 ±0.030*
LAC 200 mM	12.8 ±1.2*	8.7 ±0.9*	10.3 ±1.0*	0.5 ±0.04*	18.4 ±1.38*	0.5 ±0.036*
RAF 50 mM	27.0 ±0.6	18.8 ±2.0	20.2 ±2.0	0.8 ±0.01	30.2 ±0.39	0.8 ±0.008
RAF 100 mM	24.5 ±2.1*	17.0 ±0.6*	19.0 ±0.6*	0.8 ±0.03	26.6 ±1.16*	0.7 ±0.027
RAF 150 mM	22.4 ±1.0*	15.9 ±0.9*	18.1 ±0.9*	0.8 ±0.02	28.7 ±0.92	0.8 ±0.021
RAF 200 mM	22.0 ±1.5*	15.7 ±1.3*	17.9 ±1.3*	0.7 ±0.03*	18.7 ±1.32*	0.6 ±0.031*
SUC 50 mM	24.4 ±1.0*	15.2 ±0.7*	18.3 ±0.8*	0.8 ±0.02	28.9 ±0.98	0.7 ±0.020
SUC 100 mM	21.7 ±1.6*	15.7 ±1.5*	18.0 ±1.5*	0.7 ±0.03*	24.2 ±1.20*	0.7 ±0.030*
SUC 150 mM	15.0 ±1.5*	10.6 ±1.3*	12.2 ±1.3*	0.5 ±0.04*	22.7 ±1.60*	0.5 ±0.036*
SUC 200 mM	15.9 ±1.1*	10.7 ±0.8*	12.6 ±0.9*	0.6 ±0.04*	19.1 ±1.61*	0.6 ±0.035*
TRE 50 mM	26.3 ±1.1*	17.7 ±1.0*	21.0 ±1.0	0.7 ±0.02*	29.3 ±1.01	0.7 ±0.024
TRE 100 mM	20.6 ±1.2*	13.5 ±0.9*	16.3 ±1.0*	0.7 ±0.03*	27.2 ±1.22*	0.7 ±0.027*
TRE 150 mM	13.4 ±1.0*	9.4 ±0.8*	11.0 ±0.8*	0.5 ±0.03*	25.8 ±1.35*	0.5 ±0.035*
TRE 200 mM	11.5 ±1.1*	7.6 ±0.9*	8.9 ±0.9*	0.5 ±0.04*	18.5 ±1.65*	0.5 ±0.041*

Lactose (LAC), raffinose (RAF), sucrose (SUC), trehalose (TRE). *Means are significantly different from the control, mean (± standard error), P < 0.05.

Table 3 Post thaw evaluation by flow cytometer. The effects on mitochondrial functionality (MIT), cell disruption (CD), plasma membrane integrity (IPM), membrane fluidity (FLU), DNA fragmentation index (DFI), lipoperoxidation (LPO), concentration of reactive oxygen species (ROS) for all saccharides at different concentrations with *B. orbignyamus* sperm (n = 10 males).

Treatment	MIT (%)	CD (%)	FLU (%)	IPM (%)	DFI	LPO (%)	ROS (MFI)
Control	94.4 ±1.4	30.5 ±1.4	21.1 ±2.0	46.0 ±3.4	0.0114 ±0.0014	59.6 ±3.8	57340 ±2943.5
LAC 50 mM	75.5 ±10.5*	34.4 ±4.4	16.2 ±5.2	43.9 ±6.1	0.0111 ±0.0023	58.4 ±2.4	57865 ±1140.5
LAC 100 mM	88.5 ±4.1	37.2 ±5.0	19.0 ±5.6	48.4 ±8.7	0.0100 ±0.0011	58.0 ±5.0	77063 ±1480.1
LAC 150 mM	80.5 ±9.4	29.6 ±7.3	29.2 ±7.4	39.9 ±7.9	0.0112 ±0.0015	62.0 ±1.2	53015 ±1669.4
LAC 200 mM	86.2 ±5.7	42.7 ±2.1*	30.1 ±9.3	38.0 ±6.5	0.0110 ±0.0016	60.4 ±2.4	51671 ±1086.1
RAF 50 mM	90.4 ±1.6	20.0 ±3.6*	10.2 ±2.1*	48.2 ±9.4	0.0082 ±0.0011*	57.7 ±1.8	40027 ±5152.4*
RAF 100 mM	88.8 ±2.5	34.1 ±7.0	21.5 ±5.3	37.9 ±7.1	0.0088 ±0.0011*	58.0 ±1.9	39978 ±5400.4*
RAF 150 mM	88.1 ±9.4	37.9 ±5.9	21.2 ±6.4	41.6 ±4.2	0.0108 ±0.0012	62.4 ±1.7	40347 ±6798.1*
RAF 200 mM	87.2 ±6.1	44.9 ±9.5*	20.7 ±2.6	33.2 ±4.2*	0.0120 ±0.0011	63.7 ±2.8	43455 ±5186.7*
SUC 50 mM	85.7 ±6.3	21.9 ±5.9*	12.9 ±3.7*	39.6 ±5.4	0.0116 ±0.0026	63.3 ±3.8	55912 ±4645.1
SUC 100 mM	80.5 ±8.9*	30.4 ±6.4	32.5 ±9.9	39.5 ±6.9	0.0102 ±0.0011	62.5 ±2.8	88271 ±2406.6*
SUC 150 mM	87.5 ±6.8	31.1 ±5.5	29.4 ±9.7	37.4 ±6.2	0.0118 ±0.0012	62.1 ±2.8	59776 ±9466.0
SUC 200 mM	87.0 ±7.1	43.4 ±7.0*	26.7 ±8.5	35.1 ±7.1	0.0125 ±0.0022	61.5 ±2.0	47862 ±7310.8
TRE 50 mM	91.1 ±1.6	19.7 ±2.6*	13.8 ±3.5*	45.5 ±5.9	0.0110 ±0.0009	58.1 ±1.0	57539 ±1333.0
TRE 100 mM	86.7 ±7.5	31.4 ±7.2	29.1 ±9.3	42.2 ±5.6	0.0114 ±0.0010	62.2 ±2.9	67592 ±1115.0
TRE 150 mM	87.8 ±6.7	36.3 ±7.3	28.0 ±5.9	44.2 ±6.9	0.0136 ±0.0017*	63.2 ±3.4	68595 ±1002.3
TRE 200 mM	86.2 ±7.0	50.6 ±9.0*	37.2 ±9.7*	34.2 ±4.8*	0.0152 ±0.0011*	64.8 ±3.3	74596 ±1408.4

Lactose (LAC), raffinose (RAF), sucrose (SUC), trehalose (TRE), •median fluorescence intensity. *Means are significantly different from the control (± standard error), P < 0.05.

Table 4 Pearson's correlation ($P < 0.01$) between the parameters and concentration of saccharides.

Parameters	Concentration			
	Lactose	Raffinose	Sucrose	Trehalose
Total motility (%)	-0.49	-0.52	-0.63	-0.68
Progressive motility (%)	-0.44	-0.44	-0.63	-0.6
Average path velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0.29	-0.15	-0.28	-0.46
Curved line velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0.32	-0.20	-0.33	-0.51
Straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0.28	-0.13	-0.26	-0.43
Average path distance (μm)	-0.30	-0.14	-0.29	-0.46
Curved line distance (μm)	-0.34	-0.19	-0.35	-0.52
Straight-line distance (μm)	-0.23	-0.12	-0.27	-0.45
Straightness (%)	-0.26	-0.20	-0.30	-0.35
Linearity (%)	-0.22	-0.13	-0.24	-0.30
Wobble (%)	-0.32	-0.21	-0.42	-0.31
Beat cross frequency (Hz)	-0.40	-0.22	-0.41	-0.39
Membrane fluidity (%)	0.19			0.27
Cell disruption (%)	0.36	0.22	0.28	0.29
Plasma membrane integrity (%)		-0.20	-0.16	-0.17
Lipoperoxidation (%)				0.21
Concentration of reactive oxygen species (MFI*)		0.18		0.15

*Median fluorescence intensity

GUIDE FOR AUTHORS *Aquaculture International*

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Colour figures

Springer offers two options for reproducing colour illustrations in your article. Please let us know what you prefer: 1) Free online colour. The colour figure will only appear in colour on www.springer.com and not in the printed version of the journal. 2) Online and printed colour. The colour figures will appear in colour on our website and in the printed version of the journal. The charges are EUR 950/USD 1150 per article.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Reviewing Procedure

is sent to 2 specialist reviewers who remain anonymous unless they specifically choose to confer with the author.

Manuscript Presentation

Manuscripts should all be presented in the accepted scientific format e.a. Introduction, Materials and Methods etc. There is no separate format for short communication. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Manuscripts should leave adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for

quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

running head (shortened title)

title

author(s)

affiliation(s)

full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Abstract

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Key Words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.).

Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections.

Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the References. A source reference note should be indicated by an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

Winograd (1986, p. 204)

(Winograd 1986; Flores *et al.* 1988)

(Bullen and Bennett 1990)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
7. Book, edited:
Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London
8. Chapter in a book in a series without volume titles:
Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111
9. Chapter in a book in a series with volume title:
Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction. Handbook of experimental pharmacology*, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660
10. Proceedings as a book (in a series and subseries):
Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICA'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. *Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence)*, vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157
11. Proceedings with an editor (without a publisher):
Aaron M (1999) *The future of genomics*. In: Williams H (ed) *Proceedings of the genomic researchers*, Boston, 1999
12. Proceedings without an editor (without a publisher):
Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: *Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms*, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978
13. Paper presented at a conference:
Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978
14. Patent:
Name and date of patent are optional
Norman LO (1998) *Lightning rods*. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998
15. Dissertation:
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
16. Institutional author (book):
International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica*. Excerpta Medica, Amsterdam
17. Non-English publication cited in an English publication:
Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]
18. Non-Latin alphabet publication:
The English translation is optional.
Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov (The supramolecular structure of polymers)*. Khimiya, Leningrad
19. Published and In press articles with or without DOI:
19.1 In press
Wilson M et al (2006) *References*. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)
- 19.2. Article by DOI (with page numbers)
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086
- 19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086
- 19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086
20. Internet publication/Online document
Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999
- 20.1. Online database
Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998
- Supplementary material/private homepage
Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000
- University site
Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999
- FTP site
Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site

ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author. One corrected proof, together with the original, edited manuscript, should be returned to the Publisher within three days of receipt by mail (airmail overseas).

Offprints

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures are published at the author's expense only.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

CAPÍTULO 4

Manuscrito a ser submetido para a revista “Cryoletters”

Exogenous ATP in the cryopreservation of *Brycon orbignyamus*

Carolina Trindade Perry,¹ Carine Dahl Corcini,² Izani Bonel Acosta,² Stela Mari Meneghello Gheller,² Camila Ribeiro Carvalho Brito,² Juan Ramon Esquivel Garcia,³ Juan Ramon Esquivel Muelbert³ and Antonio Sergio Varela Junior^{1,2*}

¹Federal University of Rio Grande, Biology of Continental Aquatic Environments. Rio Grande, 96207 900, Brazil.

²Federal University of Pelotas, Veterinary Medicine. Capão do Leão, 96010900, Brazil.

³University of Southern Santa Catarina, Palhoça, 88137272, Brazil.

*Corresponding author email: varelaejas@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: ATP exogenous has been used successfully in improving motility and fertility for many animal species. However this has not yet been tested on *Brycon orbignyamus*. **OBJECTIVE:** The objective of this study was to evaluate the use of ATPe for the cryopreservation of sperm from *B. orbignyamus*. **MATERIALS AND METHODS:** The ATPe concentrations tested were 1.0 μ M, 5.0 μ M and 10 μ M combined with Beltsville Thawing Solution™ extender and dimethylformamide 7.5%. The sperm were frozen in a nitrogen vapor vessel and stored in liquid nitrogen at -196 °C. The parameters of viability post-thawing were evaluated using CASA, and flow cytometer. **RESULTS:** The ATPe did not promote improvements in spermatocinetics, in the higher concentrations caused a worsening in these parameters, also there was loss of mitochondrial functionality and greater cellular disruption with the concentration of 10 μ M. **CONCLUSION:** We do not recommend the addition of ATP for cryopreserving *B. orbignyamus*. **Keywords:** ATPe, fish, cryopreservation, motility

INTRODUCTION

The cryopreservation technique has brought undoubted benefits to the reproductive biotechnology of mammalian birds and fish, as cryopreservation protocols cause damage to cell structure and physiology, cryopreservation research always seeks new ways to improve the viability of cells in post-thawing. As molecules added to the diluents that aim to improve sperm quality we have exogenous adenosine triphosphate (ATPe) that has proven to increase motility and fertilization in humans, rats and birds (9, 22, 3). It is believed that ATPe plays a fundamental role in fertilization, being present in the female reproductive tract of mammals and birds with an increase in concentration during the ovulation period (14). Because it is a

strongly charged anion it does not readily cross the plasma membrane, the role of ATPe is presumably mediated by purinergic P2 receptors on the cell surface (4) increasing the internal concentration of Ca^{2+} and possibly regulating the process of acrosomal exocytosis (17). There is the suggestion that the plasma membrane undergoes rearrangements in its structure involving lipids and proteins during the thawing phase (13). Assuming that the incorporation of ATPe coincides with membrane structural rearrangements during thawing, the potential of ATP supplementation to improve the viability of thawed spermatozoa seems plausible (3) and in the case of fish in which the rate of consumption of ATP for flagellar movement is higher than the rate of production (5) the expected extra benefit would be an increase in rate and duration of

motility. The objective was to test the use of ATP at the concentrations of 1.0 μM , 5.0 μM and 10 μM in cryopreservation of *Brycon orbignyamus* sperm.

MATERIALS AND METHODS

Fish handling, sperm collection

Nine mature males of *B. orbignyamus* (05. \pm 1.0 kg) that were in a period (December) when reproduction was occurring were used for this study, as reproductive peak, there for hormonal induction was not necessary. They were supplied from a commercial farm (Piscicultura Panamá) located in Paulo Lopes, Santa Catarina, Brazil. All subjects were kept in tanks with water that were maintained at a constant 26 °C. Sperm was collected with a 15 mL conical tube through abdominal massage, after urogenital papilla was cleaned and dried with a paper towel to prevent milt contamination and sperm activation. Sperm collection was carried out at room temperature (~27 °C) and tubes containing sperm were placed in a cooler (9 - 10 °C) containing dry ice. After collection the evaluation visual estimation of sperm motility was done with 1 ml of semen and 99 ml of distilled water (27 °C) placed on a slide, cover slipped and analyzed with a phase contrast microscope at 200x magnification (BX Olympus 41, 400x). Only the samples containing at least 80% moving cells were used for further analysis

Sperm cryopreservation

Sperm samples from 9 males were used for this experiment with each male representing one biological replicate (n = 9). The extender solution was the Beltsville Thawing Solution (BTS™). The treatments diluted in BTS™ with are dimethylformamide (DMF) 7.5% (18) as a control and the other treatments with are DMF 7.5% as internal cryoprotectant supplemented with ATPe at the concentrations of 1.0 μM , 5.0 μM and 10 μM . There was no equilibrium time and all cryoprotectants are also maintained in a cooler (9 - 10 °C) during the freezing step. Samples from each treatment was dilution at 1/10 ratio (sperm: extender with cryoprotectant). Samples were homogenized, packed in 250 μL containers and closed with polyvinyl alcohol. The samples were then placed in aluminum racks, and were placed in a dry shipper of nitrogen vapor (Taylor-Wharton, model CP 300 dry shipper) for 12 hours before being transferred to a liquid nitrogen canister (MVE

™, VOLTA 34, GA, USA) maintained at -196°C, where samples were stored for at least 30 days (21).

After a month, the straws were thawed in a water bath at 45°C for 10s (21) and post-thaw sperm quality was immediately estimated using the CASA system and flow cytometry.

CASA evaluation

We used 5 μL distilled water for 1 μL of sperm for activate sperm and the activity was recorded using Computer Assisted Semen Analysis (CASA). In order to perform this evaluation, 10 fields with at least a total of 100 cells were captured, and the activation was repeated 2 times up to 5 field captures. The parameters evaluated were total motility, progressive motility, curvilinear speed, rectilinear speed, average path velocity, curved line distance, straight line distance, average path distance, straightness, linearity, wobble and beat cross frequency .

Flow cytometry evaluation

The Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems) was used in our study. To detect the sperm population, non-sperm cells were removed based on the FSC x SSC scatter plots (19) and debris was eliminated by staining of the cells with Hoechst 33342 (Sigma - AldrichCo. - St. Louis, MO, EUA) at a concentration of 16.2 μM , except for those samples used to measure the DNA fragmentation index. For reading the parameters, all cells were stained with fluorophores and added with calcium free PBS (80g NaCl, 11.5g KCl, 24g Na 2 HPO 4, 2g KH 2 PO 4 in 1L deionized water). A total of 10,000 events per sperm sample with a flow of 200 cells/s were analyzed using the Cytometric Attune Software V2.1 program.

Integrity of the plasma membrane

Membrane functionality was evaluated using the fluorophores SYBR-14 and propidium iodide (PI) (MiniTube, Tiefenbach, Germany). An aliquot of thawed semen was incubated for 10 min in a solution containing 0.25 μM of Sybr14 and 7.5 μM IP (as per manufacturer's instructions—Minitube). The sperm cells were classified as not-damaged and functional membrane (SYBR+/PI-), and damaged and/or non-functional membrane (SYBR+/PI+; SYBR-/PI+; SYBR-/PI-). The rate was calculated from the number of not-

damaged sperm cells with functional membrane/number of sperm cells positive for H 33342, this number was multiplied by 100 to express the percentage of spermatozoa for each category (11).

Mitochondrial functionality

The mitochondrial functionality was verified with 3.1 μM Rhodamine 123 (Sigma - AldrichCo. - St. Louis, MO, EUA), and 7.5 μM IP in 10 μL of thawed sample for 5 min. Sperm cells were classified as high functionality (high fluorescence by Rhodamine accumulation) and low functionality (low fluorescence, low accumulation of Rhodamine), and only intact spermatozoa (IP negative) were evaluated (16). The mitochondrial functionality rate was calculated by the number of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential / high sperm count potential of mitochondrial membrane + spermatozoa with low mitochondrial membrane potential * 100.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation of spermatozoa was evaluated soon after thawing. The final concentration of 1 μM Bodipy C11 (Sigma - AldrichCo. - St. Louis, MO, EUA) was added to 10 μL of sample, and incubated for 2 hours at room temperature (27 $^{\circ}\text{C}$), and only live spermatozoa were analyzed. The rate of lipid peroxidation was calculated by the median intensity of green fluorescence (peroxidized lipid) / median green fluorescence intensity + median red fluorescence (non-peroxidized lipid) * 100 (12).

Membrane Fluidity

In order to evaluate Membrane Fluidity, we used 2.7 μM hydrophobic merocyanine 540 (M540) and 0.1 μM YO-PRO-1 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) with the sample for 5 min. High fluidity (high concentration of M540) and low fluidity (low concentration of M540) cells were evaluated only for intact spermatozoa (YO-PRO-1 negative) (10). The membrane fluidity rate was calculated as the number of spermatozoa with high fluidity/ (number of spermatozoa with low fluidity + spermatozoa with high fluidity) \times 100.

Concentration of reactive oxygen species

We used the fluorescent dye 2,7' - dichlorofluorescein diacetate (Sigma - AldrichCo. - St. Louis, MO, EUA), which emits green fluorescence when oxidized by intracellular ROS, at a final concentration of 1.0 μM , and IP at a final concentration of 7.3 μM .

The median intensity of green fluorescence for only live sperm (IP-) was used (8).

Cell Disruption

We used propidium iodide (PI) (MiniTube, Tiefenbach, Germany), which emits red fluorescence, at a concentration of 7.3 μM to verify cell disruption. The sperm were classified as non-disrupted (PI negative) and disrupted (PI positive). The cell integrity rate was calculated as: the number of spermatozoa disrupted/ (the number of spermatozoa disrupted + the number of spermatozoa non- disrupted) \times 100.

DNA fragmentation index

DNA integrity was assessed by fluorescent acridine orange metachromatic probe and Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), 5 μL aliquots of sperm, TNE (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA; pH 7.2) and Triton [Triton X-100, 0.1% (v/v)] were mixed for 30 s. Acridine orange was added only at the moment of reading. The results were obtained using BL1 (green fluorescence) and BL3 detectors (red fluorescence), which equals red fluorescence / total (green+ red) fluorescence (15).

Statistical analysis

Statistix® 2009 software was used for analysis. All the variables presented normally distributed according to ShapiroWilk test, and descriptive data (mean and standard error mean) were generated for each of the dependent variables: total motility, progressive motility, curvilinear velocity, straight-line velocity, average path velocity, curved line distance, straight line distance, average path distance, linearity, straightness, wobble, beat cross frequency, mitochondrial functionality, reactive oxygen species, cell disruption, plasma membrane integrity, membrane fluidity, and DNA fragmentation index. The effects of the ATPe concentrations on the responses were tested against control analyzed of variance ANOVA, and the means were analyzed using the LSD test ($P < 0.05$). The associations between the variable responses and ATPe concentrations were determined by Pearson's correlation coefficients ($P < 0.01$).

RESULTS

Spermatic Kinetic Evaluation

The addition of ATPe in the seminal diluent for *B. orbignyamus* did not promote improvements in sperm kinetics (Table 1), and the lowest concentration of 1.0 μM did not

present differences with the control ($P > 0.05$) for all parameters evaluated. When we increased the concentrations tested to 5.0 and 10 μM we observed a worsening in motility, speeds and distances as well as linearity, wobble and straightness ($P < 0.05$), except for beat cross frequency where no differences were observed in relation to the control ($P < 0.05$).

The influence of increased concentrations can also be verified by significant negative correlations (Table 2) with most parameters of sperm kinetics ($P < 0.01$).

Table 1. Post thaw evaluation of sperm viability for all concentrations with *B. orbignyamus* sperm (n= 9 males).

Parameters	Control	ATP 1.0 μM	ATP 5.0 μM	ATP 10 μM
Total motility (%)	46.6 \pm 1.7	45.9 \pm 2.1	35,9 \pm 1.6*	34.8 \pm 1.4*
Progressive motility (%)	33.7 \pm 1.8	38.0 \pm 2.0	27.9 \pm 1.5*	26.3 \pm 1.4*
Curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$)	65.0 \pm 1.4	62.1 \pm 1.5	48.8 \pm 1.6*	55.2 \pm 2.6*
Straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$)	46.1 \pm 1.3	42.9 \pm 1.2	31.4 \pm 1.4*	35.3 \pm 2.9*
Average path velocity ($\mu\text{m/s}$)	52.4 \pm 1.3	49.6 \pm 1.2	37.7 \pm 1.4*	41.3 \pm 2.8*
Curved line distance (μm)	29.5 \pm 1.1	28.8 \pm 0.7	22.4 \pm 0.7*	25.6 \pm 0.8*
Straight line distance (μm)	20.9 \pm 1.2	19.9 \pm 0.6	14.5 \pm 0.6*	16.3 \pm 0.6*
Average path distance (μm)	23.7 \pm 1.2	23.5 \pm 0.6	17.4 \pm 0.6*	19.1 \pm 0.7*
Straightness (%)	0.84 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01	0.77 \pm 0.02*	0.80 \pm 0.02*
Linearity (%)	0.66 \pm 0.013	0.68 \pm 0.02	0.60 \pm 0.018*	0.60 \pm 0.015*
Beat cross frequency (Hz)	30.0 \pm 0.46	31.5 \pm 0.80	31.8 \pm 0.43	30.0 \pm 0.52
Wobble (%)	0.77 \pm 0.010	0.79 \pm 0.008	0.73 \pm 0.019*	0.71 \pm 0.015*
Lipoperoxidation (%)	60.6 \pm 3.6	60.4 \pm 1.6	62.2 \pm 1.4	63.3 \pm 3.7
Reactive oxygen species (MFI)	51122 \pm 9303.4	45476 \pm 7858.5	58495 \pm 9772.1	44814 \pm 7135.0*
Cell disruption (%)	30.9 \pm 5.4	28.2 \pm 2.0	29.7 \pm 3.4	41.8 \pm 6.3*
Mitochondrial functionality (%)	94.4 \pm 1.4	83.6 \pm 7.7*	82.9 \pm 4.1*	83.4 \pm 9.4*
Membrane fluidity (%)	21.1 \pm 8.2	23.3 \pm 7.8	19.9 \pm 7.5	19.9 \pm 7.0
Plasma membrane integrity (%)	46.0 \pm 6.2	46.9 \pm 6.0	40.7 \pm 9.4	41.1 \pm 8.7
DNA fragmentation index	0.0111 \pm 0.002	0.0082 \pm 0.001	0.0114 \pm 0.001	0.0088 \pm 0.002

*Median fluorescence intensity. *Means are significantly different from the control (\pm standard error), $P < 0.05$.

Table 2. Significant Pearson's correlation ($P < 0.01$), between parameters and concentration of ATP.

Parameters	Concentration
Total motility (%)	-0,23
Progressive motility (%)	-0,20
Curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0,21
Straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0,19
Average path velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0,22
Curved line distance (μm)	-0,19
Straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$)	-0,21
Average path distance (μm)	-0,22
Straight line distance (μm)	-0,14
Linearity (%)	-0,19
Wobble (%)	-0,19
Cell disruption (%)	0,37

Flow cytometric assay

The evaluation using the flow cytometric (Table 1) showed that the fluidity, membrane integrity, lipoperoxidation and DNA fragmentation were not influenced by the addition of ATP and did not present differences in relation to the control for all the concentrations evaluated ($P > 0.05$). The mitochondria had their function decreased by the addition of ATP at all concentrations ($P < 0.05$) and the cellular disruption was higher with the concentration of 10 μM ($P < 0.05$). The concentration of 10 μM presented lower ROS production ($P < 0.05$).

DISCUSSION

This is the first study to evaluate the use of ATPe in the cryopreservation of *B. orbignyamus* sperm. Despite the benefit of the use of ATPe in mammals and birds (9, 22) we have verified that ATPe did not improve the control. Even though ATPe was the main source of energy for motility, higher concentrations (5.0 and 10 μ M) caused loss of motility, velocity and distances in *B. orbignyamus* spermatozoa. If we assume that there was incorporation of ATPe at the moment in which membrane structural rearrangements occur during the thawing (13) we can affirm that the cells of *B. orbignyamus* were not able to use the ATP for energy generation, as well as some benefit that it can bring as a signaling molecule. In rat studies, a shift in motility with increased velocities and linearity has been observed suggesting that the mechanism of action of extracellular ATP is by induction of a rapid increase in intracellular calcium concentrations that facilitate hyperactive motility (20). In the case of fish from external fertilization, the motility is triggered by intracellular ionic changes (K^+ and Ca^{+2}) produced by osmolarity difference, only at the moment when the spermatozoa are released in the medium (6).

Regarding the possibility of using the ATPe as an energy source also seems unlikely, since in fish the reproductive strategy will decide on the ability of their spermatozoa to metabolize exogenous and / or endogenous substrates. In species subjected to internal fertilization, spermatozoa may metabolize the extracellular substrate, similar to that found in mammals or birds. In species submitted to external fertilization, spermatozoa cannot rely on the external medium to sustain their energy supply, since they have less capacity to metabolize the extracellular substrate (7)

In an experiment with the addition of ATP-Mg (2) observed that beat cross frequency did not exceed 50Hz and decreased proportionally with the decrease in ATP-Mg concentration. However, with the use of cellular respiration inhibitors / blockers, immobilization immediately occurred, suggesting that ATP is supplied entirely by an endogenous production by mitochondria during the motile period, corroborating the impossibility of fish from external fertilization using a source of Exogenous ATP, coinciding with the results of

(1) we tested ATPe in *Colossoma macropomum* not observing improvements in the motility and increased beat cross frequency.

The increase in ATP concentration caused a progressive decrease in sperm kinetic parameters (dose dependence) as can be verified by correlation analysis (Table 2). A positive correlation was also observed between the cellular disruption with the concentrations, and in the concentration of 10 μ M a greater rupture was observed. In our study the addition of ATP caused losses in mitochondrial functionality from the lowest concentration tested.

Due to no evidence of benefit we do not recommend the use of ATP for cryopreservation of *B. orbignyamus*.

Acknowledgements: We would like to thank the Foundation of support and protection of research of Rio Grande do Sul, FAPERGS for the financing project n° 17/2551-0001276-3/PqG 02/2017 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Projeto n° 307195/2015-7 Projeto Universal 2018. The researchers, AS Varela Jr and CD Corcini thanks CNPQ for the productivity guaranteed. Thanks to Piscicultura Panamá, for the animals and facilities assigned and the team of the Comparative Animal Reproduction (RAC) for the support in collections and analysis.

REFERENCES

1. Alves FP (2015) Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil 46p.
2. Billard R, Cosson J & Crim LW (1993) Motility and Survival of Halibut Sperm During short- term storage Aquat Living Resour **6**, 67-75.
3. Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE & Donoghue AM (2011) Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. Anim. Reprod. Sci. **123**, 242-248.
4. Burnstock G (2006) Purinergic signalling. Br J Pharmacol **147**, 172-181.
5. Christen R, Gatti JL & Billard R (1987) Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to

- changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur. Journal Biochem.* **166**, 667–671.
6. Cosson J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac. Int.* **12**, 69-85.
 7. Cosson, J. (2012) ATP, the sperm movement energizer. Adenosine triphosphate: Chemical properties, biosynthesis and functions in cells. Nova Publisher Inc, New York , pp.1-46.
 8. Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Garde JJ & Fernández- Santos MR (2011) Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide and importance of individual male variability. *Reprod. Domest. Anim.* **46**, 393-403.
 9. Edwards SE, Buffone MG, Knee GR, Rossato M, Bonanni G, Masiero S, Ferasin S, Gerton GL, Moss SB & Williams CJ (2007) Effects of extracellular adenosine 5'-triphosphate on human sperm motility. *Reprod. Sci.* **14**, 655-666.
 10. Fernández-Gago R, Domínguez JC & Martínez-Pastor F (2013) Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology* **80**, 400-410.
 11. Figueroa E, Valdebenito I, Zepeda AB, Figueroa C A, Dumorné K, Castillo RL & Farias JG (2017) Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquac.* **9**, 76-87.
 12. Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL & Meyers SA (2012) Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Plos One* **7**, e39397.
 13. Holt WV, Head M F & North R D (1992). Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* **4**, 1086-1094.
 14. Karuhn, R. F. (1977) U.S. Patent No. 4,036,212. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 15. Lewin LM, Golan R, Freidlin P & Shochat L (1999) A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* **124**, 133-137.
 16. Liu Q, Wang X, Wang W, Zhang X, Xu S, Ma D, Xiao Z, Xiao Y & Li J (2015) Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane cryopreservation. *Fish Physiol. Biochem.* **41**, 413-422
 17. Luria A, Rubinstein S, Lax Y & Breitbart H (2002) Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol. Reprod.* **66**, 429-437.
 18. Perry CP, Corcini CD, Ancuti AN, Otte MV, Soares SL, Esquivel JR, Muelbet RE, Varela AS (2019). Amides as cryoprotectants for the freezing of *Brycon orbignyanus* sperm. *Aquaculture*
 19. Petrunkina AM, Volker G, Weitz KF, Beyerbach ME, Töpfen-Petersen & Waberski D (2005) Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* **63**, 2278-2299.
 20. Rodríguez-Miranda E, Buffone MG, Edwards SE, Ord TS, Lin K, Sammel MDGL, Gerton, SB Moss & Williams CJ (2008) Extracellular adenosine 5' -triphosphate alters motility and improves the fertilizing capability of mouse sperm. *Biol. Reprod.* **79**, 164-171.
 21. Varela JAS, Corcini CD, Gheller SMM., Jardim RD, Lucia JT, Streit JDP, Figueiredo MRC (2012) Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* **78**, 244–251.
 22. Yamashiro H, Toyomizu M, Kikusato M, Toyama N, Sugimura S, Hoshino Y, Hiroyuki Ab Stefan Moisyadi & Sato E (2010). Lactate and adenosine triphosphate in the extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **49**, 160-166.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS CryoLetters

The journal publishes concise original research reports, authoritative reviews, technical developments and commissioned book reviews of the effects produced by low temperatures on a wide variety of biophysical and biological processes, or studies involving low temperature techniques in the investigation of biological and ecological topics. The Journal will accept papers that reach a high standard of scientific endeavour as judged by international peer review. Contributions are peer-reviewed by an international editorial board and referees, and normally published within eight weeks of receiving an acceptable manuscript. There are no page charges and we offer a free pdf. file to authors. Circulation is world-wide and the journal is abstracted by all major services.

Manuscript Layout

1. Papers will be edited directly from authors' electronic submissions, using the downloadable template which therefore must conform to a standardised house-style, be accurate, clear and well laid out. For speed of publication, no proofs are printed, and final responsibility for accuracy rests with author(s) who may be contacted by the editor for clarification during sub-editing.
2. Authors have access to a downloadable template for authors which must be used for submission of their article. Double column format is directed simply by the using template (see Template Instructions below - point 16 onwards) with page numbering .
3. Contributions must be concise and no longer than 12 pages. Because of pressure on space a maximum of 12 pages including figures, tables and references is allowed. Manuscripts longer than 12 pages will be returned to the author for shortening unless prior agreement has been reached with the editor.
4. Electronic submission is essential, using the downloadable template. Manuscripts should be singlespaced with the text in Times (New) Roman 12 point font. Manuscripts which do not conform to this specification may be returned for resetting. (In the event of difficulty in conforming to the specification, contact the editorial office for help). All Final Printing will normally be in Black and White . Images can only be accepted for Colour Printing by prior arrangement to pay the costs of printing (£150 per page). Images should only be submitted in colour if the authors state that they agree to pay for the colour images in the Letter of Submission. This decision must be taken by the authors before submitting the manuscript for assessment to ensure consistency in the refereeing procedure.
5. Author Open Access. Authors may choose to select Open Access option at the time of manuscript submission. A modest fee is charged to cover administrative costs. You will be asked to confirm that you will pay the open access fee (600 Euros) when invoiced. You will need to choose the 'Open Access' option when you first submit your paper to the Editorial Office. The article will be made available by Ingenta Open Access on receipt of the fee.

6. The title page should have:
 - The TITLE (in 14-point font) in BOLD CAPITALS CENTRED on the page with a 50 mm top margin
 - This should be followed by the Author(s)' names (regular font) separated from the title by a single line space, centred and indicated by an asterisk* the author to whom correspondence should be addressed. The last author name should be preceded by 'and'. To assist information retrieval, titles should be specific and informative
 - The full correspondence address(es) should left-adjusted and separated by a single line space from the author names. Additionally, a valid email contact address must be given. Superscripted numeral should be used to indicate which addresses are associated with which authors
 - An Abstract of no more than 150 words, with bold, initial capital centred heading. The abstract should be specific and informative to assist retrieval
 - Up to six Keywords: (heading left adjusted) continuing the line.
7. The text should normally be divided into conventional sub-sections : Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References. These headings should be BOLD, CAPITAL and CENTRED. Any Acknowledgements: (heading left adjusted) should appear after the text (before the References) continuing the line.
8. The text (see Template Instructions - point 16 onwards) should be fully justified and continuous with no spaces between paragraphs, the first line of which should be indented approximately four spaces. Subheadings should be in lower case italic with initial capital. Sub-subheadings should be in regular script underlined with initial capital and conclude with colon or full stop; text should then continue the line. If you use a font other than Times Roman or Arial to prepare the document, please ensure that all characters are properly converted to Times Roman or Arial before submitting the document to the editorial office. Please use the correct characters for degree Celsius ($^{\circ}\text{C}$) not the superscripted o. Statistical symbols should be italicised according to this example (P, F, t, χ).
9. Tables should be included in the text. All tables (titles, footnotes, table entries) should be clearly distinguished from the main text by changing to a sans-serif font such as Arial 11-point (this is an example to allow 10% reduction by the printer without loss of legibility, and separated by at least one line from the text above and below. Do not include vertical lines, and keep horizontal lines to the minimum to distinguish the column headings.
10. Figures, graphs, structural formulae etc., should be prepared by computer using a common spreadsheet or graphics package such as Microsoft Excel (see Template Instructions - point 16 onwards). Remove all horizontal scale lines from graphs and do not box in either the axes or the whole figure. Line drawings should be sufficiently bold to remain clear after 10% reduction. Figure legends (axis labels, keys) should be clearly distinguished from the main text by changing to a sans-serif font such as Arial 11-point allowing 10% reduction by the printer without loss of legibility. In general unless there is reason to choose 'standard deviation' for error bars standard error of the mean (abbreviated SEM) is preferred. Figure legends should carry enough information to be understood without detailed reference to the text. Numbers of replicates for calculation of the statistical significance should be given. Figures should be included directly in the

text. **IT IS VERY IMPORTANT THAT YOU CHECK THE APPEARANCE OF THE FONTS USED AFTER IMPORTING THE FIGURE INTO THE FILE TO ENSURE THEY ARE OF SUFFICIENT SIZE STILL TO BE LEGIBLE AFTER A 10% REDUCTION.** If you use a font other than Times Roman or Arial to prepare the document, please ensure that all characters are properly converted to Times Roman or Arial before submitting the document to the editorial office.

11. Photographs should be submitted electronically embedded in the text (see **Template Instructions** - point 16 onwards) Authors should bear in mind that the page size before reduction is 160 x 250mm and the photograph should fit within that area allowing space for legend. If at all possible, photographs should be grouped together, bearing in mind the maximum possible size. Good contrast is imperative. Labelling should be black or white according to maximum contrast in Arial 11-point font, or similar. For **micrographs**, a **scale bar** indicating magnification should be shown on the photographic print. If several images are used in a figure, they should be electronically grouped
Units: SI units are preferred. Consistency is essential.
12. References should be referred to in the text by number in parenthesis (5, 21) and should be arranged after the text in alphabetical order and numbered 1...n in the form indicated by the following examples (all authors should be listed). Standard abbreviations for journal titles may be used.:
 - Reed BM (2001) *Cryoletters* **22**, 97-104.
 - Thurston LM, Watson PF & Holt WV (2003) *Theriogenology* **60**, 101-113.
 - Songsasen N, Tong J & Leibo S (1998) *J Exp Zool* **280**, 189-196.
 - Withers LA & Engelmann F (1997) in *Agricultural Biotechnology*, (ed) A Altman, Marcel Dekker Inc, New York, pp 57-88.
13. The Journal maintains its high standard by means of expert refereeing by an international panel. After review, if considered worthy of publication the manuscript will normally be returned for revision as recommended by the referee(s).
14. Revised manuscripts must be marked up to show revisions as requested by the Editorial Office. CryoLetters is a rapid publication journal and the **responsibility** for the **appearance** of the final revised article **rests with the Authors**.
15. **Ethical standards**
 - All experimental work involving animals should conform to European Convention on the use of Experimental Animals ([website](#)) and the Directive ([PDF](#)) that seeks to implement it. Where appropriate, authors should state that animal experiments were conducted in accordance with a named National Policy or Licensing Authority and were approved by the Institutional Ethics Committee. Experimental methods should include details of anaesthetic (generic name, dose, route of administration) and surgical procedures. Chilling alone is not an acceptable method for rendering vertebrates insentient; an anaesthetic agent must be used. Work on isolated tissues, including primary cell cultures, must state from where and how the materials were derived.
 - All work involving humans or human tissues or cells must contain in the text a statement that approval for the study has been obtained from the appropriate National or Institutional Ethics Committee and conforms to the standards set by the Declaration of Helsinki (last modified in 2004-www.wma.net/e/policy/b3.htm), and that material was obtained only with Informed Consent in writing for each individual in the study.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As espécies diferem no que se diz respeito ao congelamento, já que variam conforme a diferente biologia, por isso, um protocolo universal não pode ser sugerido, assim, os protocolos de criopreservação devem ser adaptados para encontrar comprometimentos específicos para cada espécie, o número crescente de estudos descrevendo métodos para criopreservar espermatozoides em muitas espécies, evidencia essa diversidade (CABRITA et al., 2009). A espécie *Brycon orbignyamus* já teve diversos protocolos testados para o congelamento do esperma (MURGAS et al., 2003; LÓPEZ et al., 2015; VIVEIROS et al., 2015) em nossos estudos testamos crioprotetores penetrantes, no caso a amida DMF na concentração de 7.5%, que se mostrou mais eficaz que os crioprotetores testados em estudos anteriores, posteriormente combinamos o sacarídeo com DMF 7.5% e a rafinose 50 Mm, apesar de não promover aumento da motilidade promoveu maior proteção ao DNA e as membranas plasmáticas. Por sua vez testamos também o ATPe que se demonstrou ineficaz na criopreservação para esta espécie.

A motilidade continua sendo um dos parâmetros mais importantes para análise da viabilidade, mas a avaliação da estrutura e função celular, no nosso caso através do citômetro de fluxo, permitiu avaliar parâmetros dos processos de congelamento-descongelamento e fornecer informações mais detalhadas sobre os efeitos desses processos que reduzem a qualidade do esperma. Por exemplo, o processo de criopreservação pode induzir diferentes tipos de danos aos espermatozoides, como a fragmentação do DNA (PÉREZ-CEREZALES et al., 2010; SANTOS et al., 2013) bem como aumentos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzindo alterações no nível do DNA (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012). A integridade do DNA deve ser garantida para o sucesso do desenvolvimento embrionário após a fertilização. A avaliação da qualidade do esperma usando as ferramentas disponíveis tais como testes de viabilidade, análise de motilidade, integridade de DNA, entre outros, são decisivos para a seleção de boas amostras de esperma e para a padronização do protocolo de criopreservação projetado (CABRITA et al., 2009).

Os criobancos com espermias criopreservadas que garantem a máxima qualidade e viabilidade possíveis são importantes em programas de conservação, por isso a necessidade de elaborar e pesquisar novos protocolos e formas de avaliações mais eficazes dos processos de congelamento. Em se tratando de conservação das espécies a utilização da técnica vai muito mais além do que simplesmente congelar amostras de sêmen, esforços maiores são imprescindíveis para o retorno da utilização da criopreservação na conservação das espécies. A criopreservação é uma ferramenta que deve ser usada em conjunto com políticas de sustentabilidade, como incentivo a criação de bancos

vivos e principalmente conservação dos estoques genéticos *in situ* (no habitat da espécie). O uso dos criobancos tem contribuído na conservação de muitas espécies em perigo de extinção, mas ainda estão longe de garantir a conservação da biodiversidade da fauna de peixes, o ritmo acelerado da degradação ambiental faz com que muitas espécies aquáticas desapareçam sem mesmo tomarmos conhecimento de sua existência. Programas de conservação *ex situ* para a fauna de peixe estão muito mais focados em espécies de interesse econômico como certos salmonídeos (WALSON, 1998; HORVÁTH et al., 2012) e esturjões (AKBULUT et al., 2011; WANG et al., 2011) do que em outras com menor valor econômico agregado.

A criopreservação é uma ferramenta que pode ajudar a garantir o futuro de muitas espécies, mas ainda é essencial políticas de conservação e principalmente a preservação do habitat.

Referências

AKBULUT, B. et al. Stimulating sturgeon conservation and rehabilitation measures in Turkey: an overview on major projects (2006–2009). **Journal of Applied Ichthyology**, V.27, n.2, p. 415-419, 2011.

CABRITA, Elsa; ROBLES, Vanesa; HERRÁEZ, Paz. **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. CRC Press, 2008.

HORVÁTH, Á. et al. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). **Aquaculture**, v. 358, p. 213-215, 2012.

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

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. et al. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, 2012.

MURGAS, Luis David Solis; FRANCISCATTO, Renan Toledo; SANTOS, Anna Graciela Oliveira. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

PÉREZ-CEREZALES, S. et al. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 605-613, 2009.

SANTOS, R. et al. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 6-11, 2013.

VIVEIROS, Ana TM 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**, v. 41, n. 1, p. 193-201, 2015.

WADA, K.T. **The Present Status of Genetic Conservation of Cultured Aquatic Species in Japan**. In: HARVEY et al., (ed). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p.225-232.

WALSO, O. **The Norwegian Gene Bank Program for Atlantic Salmon (Salmo salar) - In:** HARVEY et al., (ed). Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity, Vancouver, Canada, Feb. 16-18. World Fisheries Trust, Victoria, 1998. p. 97-104.

WANG, J. H.; WEI, Q. W.; ZOU, Y. C. Conservation strategies for the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: an overview on 30 years of practices and future needs. **Journal of applied ichthyology**, v. 27, n. 2, p. 176-180, 2011.

ANEXOS

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
cpeua@furg.br <http://www.prosp.furg.br>

CE 



CERTIFICADO Nº P038/2018

Certificamos que o projeto intitulado "Crioconservação do esperma de *Brycon orbignyanus* visando a preservação em banco de germoplasma e avaliação do meio de ativação na dinâmica espermática", protocolo nº 23116.002885/2018-64, sob a responsabilidade de Antonio Sergio Varela Junior - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.898, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 26 de setembro de 2018 (Ata 009/2018).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq007/2018
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	
VIGÊNCIA DO PROJETO	20/05/2019
ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA	<i>Brycon orbignyanus</i> (piracanjuba)
NÚMERO DE ANIMAIS	10
PESQUISA	900 g / 2 anos
SEXO	Macho
ORIGEM	Piscicultura Panamá, Estrada Geral Bom Retiro, Km 8, Paulo Lopes, SC
ENVIO DO RELATÓRIO PARCIAL	Janeiro/2019
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Junho/2019

Rio Grande, 26 de setembro de 2018.


Med. Vet. Márcio de Azevedo Figueiredo
Coordenador da CEUA-FURG

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CE




AUTORIZAÇÃO PARA USO DE MAIS ANIMAIS Nº 006/2018

PROCESSO Nº	23116.002685/2018-64
CEUA Nº	Pq007/2018
UNIDADE	Instituto de Ciências Biológicas
TÍTULO DO PROJETO	Criopreservação do esperma de <i>Brycon orbignyianus</i> visando a preservação em banco de germoplasma e avaliação do meio de ativação na cinética espermática
NÚMERO DE ANIMAIS E VIGÊNCIA	10 – 20/05/2019
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Junho de 2019
PROFESSOR RESPONSÁVEL	Antonio Sergio Varela Junior

PARECER DA CEUA:

Após a análise de sua solicitação de utilização de mais 10 animais, realizada em 22 de novembro de 2018, o seu pedido foi considerado **APROVADO**, pois cumpre o disposto na Lei no 11.794, nas demais normas aplicáveis e nas Resoluções Normativas e Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)..

Rio Grande, 28 de novembro de 2018.


Med. Vet. Marcio de Azevedo Figueiredo
Coordenador da CEUA-FURG