



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



**Dimetil sulfóxido, Etileno glicol e Glicerol na
criopreservação seminal de *Geophagus brasiliensis*.**

Jôsie Schwartz Caldas

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Desessards Jardim

Rio Grande
2014



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



**Dimetil sulfóxido, Etileno glicol e Glicerol na criopreservação
seminal de *Geophagus brasiliensis*.**

Aluno(a): Jôsie Schwartz Caldas

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Desessards Jardim

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

Rio Grande
2014

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por ser fonte de luz no meu caminho, fortaleza e perseverança para enfrentar os desafios da vida.

Agradeço aos meus pais, Serli Schwartz Caldas e José Fernando Camacho Caldas pelo apoio, base familiar, educação e incentivo, fatores que contribuíram para me tornar a pessoa que sou. Também, pela confiança depositada, por nunca medirem esforços, fazendo tudo o que estava ao alcance e, muitas vezes, abdicando dos seus sonhos para que eu realizasse os meus.

Ao meu amor e amigo Marcelo Crestani Mota, incentivador e presença sempre constante em minha vida, pelo amor, amizade, apoio, compreensão e pelo incentivo à busca dos meus ideais. Pela paciência, compreensão e privação do convívio, aos meus queridos amigos e familiares.

Pelo convívio sincero e amigável, agradeço aos meus colegas de curso, amigos e colegas, Técnicos e Professores do Instituto de Ciências Biológicas, em especial, ao amigo Dr. Josencler Ferreira Ribas e à amiga Dr^a. Ana Cristina Kalb, que contribuíram no meu crescimento pessoal e profissional através das suas orientações, conselhos e ensinamentos. As Técnicas Carol, Sabrina e Miriam, do Laboratório de Histologia (Depto de Morfologia), pelo convívio sincero e amigável, auxílio e colaboração nos trabalhos.

Também agradeço a todos os amigos e colegas, do Grupo de pesquisa em Reprodução Animal Compara – RAC, em especial, às Pós-graduandas: Estela Fernandes da Silva e Tainã Figueiredo Cardoso, amigas, parceiras de todas as horas, que não mediram esforços para a realização deste e de muitos trabalhos. Além das Pós-graduandas: Izani Bonel Acosta, Janaína Camacho Silva, Juliana do Prado Alves e dos Estagiários: Alessandra Cardoso Silva, Clarissa da Silva Freitas e Joziel Gonçalves Botelho, que colaboraram em todos os trabalhos que realizei e permaneceram ao meu lado tanto nos momentos bons como nos momentos difíceis.

Um agradecimento especial àqueles amigos e colegas que não mencionei, mas que com certeza, colaboraram para a minha formação pessoal e profissional durante esta pós-graduação.

À Universidade Federal do Rio Grande e à Universidade Federal de Pelotas, pela estrutura e apoio ao desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa, pois sem ela, não poderia me dedicar exclusivamente aos estudos.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Mário Roberto Chim Figueiredo pela colaboração, auxílio e orientação quanto aos peixes e oportunidade de conhecer um pouco da área da Aquicultura através do trabalho paralelo desenvolvido na Estação de Aquicultura Continental Saco do Justino – FURG, bem como, ao Prof. Dr. Leandro Garcia (Aquicultura – FURG) e aos amigos e colegas que fiz no momento desse trabalho, especialmente: Ariane, Abdel, André, Bruna, Daniel, Giovana, Claudia, Ademar, Técnica Sabine e Prof. Carlos (Lab. de Química de alimentos – FURG centro).

Ao colega e professor Michel Davi Gerber (IFSul / UFPel) pela oportunidade de trabalho em sua pesquisa, a qual conferiu-me parte do conhecimento e experiência na minha formação durante esta pós-graduação.

A todos os professores do Curso de Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pois participaram do meu desenvolvimento acadêmico, contribuindo de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Rodrigo Dessessards Jardim, co-orientador deste trabalho, pelo auxílio, colaboração na pesquisa e contribuição na minha formação.

Um agradecimento especial à Prof.^a Dr.^a. Carine Dahl Corcini, pela colaboração e orientação neste e em muitos trabalhos, pela paciência, compreensão e esmero, mesmo quando atribulada e dividida em muitas atividades, como mãe, esposa, coordenadora, professora e pesquisadora. Um exemplo de profissionalismo e competência.

Enfim, um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior, pelas oportunidades concedidas: de conhecer a área de pesquisa em reprodução animal; de trabalhar com tecnologias que nem imaginava conhecer; pela oportunidade de adquirir experiência em experimentos e na pesquisa; pelo crescimento pessoal e profissional através do convívio sincero e amigável e trabalhos em equipe; pelo apoio e auxílio em suas orientações durante a realização deste trabalho. Um ótimo profissional, um homem gentil e de bom coração.

RESUMO

O peixe *Geophagus brasiliensis*, nativo brasileiro é explorado comercialmente como peixe ornamental, podendo, no futuro, ter reduzidos os estoques naturais. Com isso, a criopreservação pode garantir a sobrevivência e diversidade genética dessa espécie nativa. O objetivo deste estudo foi testar a eficiência crioprotetora e do Dimetil sulfóxido, Etileno glicol e Glicerol em sêmen de *G. brasiliensis*, utilizando os parâmetros espermáticos motilidade (taxa e tempo de motilidade), integridade de membrana e DNA, funcionalidade mitocondrial e espécies reativas de oxigênio (ERO). Os machos (n=12) foram obtidos de pescadores profissionais da Laguna dos Patos, tiveram seu sêmen coletado por massagem abdominal e diluído (1:9 v/v) em *Betsville Thawing Solution* para avaliação dos parâmetros espermáticos. As amostras seminais foram diluídas nos diferentes tratamentos com crioprotetores DMSO, EG e GLI nas concentrações (5, 10, 15 e 20%). Sendo então, congeladas em Dryshipper e posteriormente armazenadas em botijão de Nitrogênio líquido à -196°C, por no mínimo 15 dias. Posteriormente, descongeladas em banho-maria a 37° C por 8 segundos e as análises espermáticas refeitas. Todas as análises espermáticas foram realizadas por citometria de fluxo, exceto a motilidade (taxa e tempo) analisada ao microscópio de contraste de fases. Os resultados foram avaliados estatisticamente no programa Statistix 9.0 (2008). Os tratamentos com BTS, DMSO e EG, nas concentrações de 5%, não diferiram na quantidade de ERO ($P>0.05$). Os tratamentos com DMSO 10, 15 e 20% obtiveram os melhores resultados de integridade de membrana ($P<0.05$). A Funcionalidade mitocondrial foi semelhante nos grupos com DMSO 10 e 15% e EG 5% ($P>0,05$). Todos os tratamentos mantiveram a integridade do DNA ($P>0,05$). O DMSO 10% apresentou melhores médias de motilidade (taxa e tempo), sendo essas de 24% e de 160 segundos. O DMSO 10% foi o tratamento mais eficiente na criopreservação seminal de *G. brasiliensis*.

Palavras-chave: Cará, peixe, reprodução, espermatozoide, crioprotetor, BTS.

ABSTRACT

The *Geophagus brasiliensis* fish, Brazilian native is commercially exploited as ornamental fish, and may in the future have reduced the natural stocks. Thus, cryopreservation can ensure the survival and genetic diversity of this and other native species. The aim of this study was to test the efficiency of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol in semen *G. brasiliensis*, using the sperm motility parameters (rate and time), membrane and DNA integrity, mitochondrial function and reactive oxygen species (ROS). The fishes (n = 12) were obtained from fishermen of the Patos Lagoon, The semen was collected by abdominal massage and diluted (1:9 v / v) in *Betsville Thawing Solution* (BTS) for evaluation of sperm parameters. The samples were diluted in cryoprotectant treatments, DMSO, EG and GLI at different concentrations (5, 10, 15 and 20%) and frozen in *Dryshipper* and subsequently stored in liquid nitrogen (-196 ° C) for at least 15 days. Subsequently thawed in a water bath at 37 ° C for 8 seconds and remade sperm analysis. All analyzes were performed by flow cytometry, except motility (rate and time) analyzed by phase contrast microscopy. The results were evaluated statistically in Statistix 9.0 (2008) program. Treatments with BTS, EG and DMSO, at concentrations of 5%, did not differ in the amount of ROS ($p > 0.05$). Treatment with DMSO 10, 15 and 20% achieved the best results of membrane integrity ($P < 0.05$). Mitochondrial functionality was similar in the groups with 10 and 15% DMSO and 5% EG ($P > 0.05$). All treatments were maintained the integrity of DNA ($P > 0.05$). The 10% DMSO showed better average motility (rate and time) which are 24% and 160 seconds. DMSO 10% was the most effective treatment cryopreservation of semen in *G. brasiliensis*.

Key-words: Cará, Fish, Reproduction, Sperm, Cryoprotector, BTS.

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	9
Crioprotetores	10
Sêmen de peixe – Espermatozoide e plasma seminal	14
Motilidade espermática	15
Funcionalidade mitocondrial	17
Integridade de Membrana celular e DNA	17
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) na criopreservação seminal	19
Avaliação por citometria de fluxo	20
Espécie de estudo	21
Referências	23
CAPÍTULO 1	32
INTRODUÇÃO	34
MATERIAIS E MÉTODOS	36
Coleta e avaliação do sêmen (pré-congelamento)	36
Criopreservação seminal.....	37
Descongelamento seminal	37
Análise por citometria de fluxo	38
Integridade da membrana plasmática	38
Funcionalidade mitocondrial	39
A integridade do DNA.....	39
Avaliação de ERO	40
Análise Estatística	40
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	49

LISTA DE TABELAS

ANEXO.....	49
Tabela 1 – Osmolalidade e pH das soluções crioprotetoras utilizadas.	49
Tabela 2 – Avaliações espermáticas por citometria de fluxo: Funcionalidade de Mitocôndria, Integridade de Membrana e DNA e, em tratamentos com diferentes crioprotetores.	50
Tabela 3 - Motilidade espermática (taxa e tempo) de sêmen de <i>G. brasiliensis</i> e avaliação de EROs por citometria de fluxo.....	51

INTRODUÇÃO GERAL

Os ambientes aquáticos continentais desempenham importante papel sócio-ambiental, uma vez que oferecem inúmeros serviços à sociedade, como fonte de água doce para o consumo, locais de turismo e lazer, assim como atuam na regulação do regime hidrológico local e, e contribuem significativamente para a manutenção da biodiversidade (JUNK et al., 2014). Muitos desses ambientes interagem com o continente e o oceano, sofrendo influências de ambos (ESTEVES, 1998). Dessa forma, sua biodiversidade está sujeita às mudanças climáticas e alterações ambientais, além da influência da ação antrópica decorrente da globalização.

Talvez a poluição causa por ação antrópica seja um dos impactos mais devastadores, visto que, aumenta os fluxos de sedimentos e nutrientes, acelerando o processo de envelhecimento dos ambientes aquáticos, causando alterações indesejáveis, com prejuízos à sua biodiversidade (ESTEVES, 1998). Além da poluição, é possível citar outros fatores que interferem no equilíbrio desses ambientes, tais como: a introdução de organismos exóticos, que competem com espécies nativas em seus mais diversos nichos podendo até mesmo exterminá-las através da predação (LIVENGOOD e CHAPMMAN, 2011); a destruição de ambientes aquáticos com a crescente expansão de cidades, construção de estradas e outros empreendimentos (JUNK et al., 2014), bem como, a exploração exacerbada dos recursos dos ambientes aquáticos, que reduz os estoques naturais de diversos organismos (IBAMA, 2008).

Dominando a biodiversidade dos ambientes aquáticos e sujeitos às imposições das variantes ambientais e interferências antrópicas, estão os peixes. Estes fazem parte do grupo de vertebrados com maior diversidade adaptativa, tanto em relação às adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas, quanto na sua ecologia (HELFMAN et al., 1999). Devido a importância desses organismos, torna-se necessária a utilização de ferramentas que colaborem para a sua preservação. Mecanismos de proteção ambiental, tais como legislação e criação de áreas prioritárias para a conservação, além da construção de aquários e oceanários são fundamentais, entretanto, a preservação da variabilidade genética pode servir de peça chave na conservação de inúmeras espécies.

Nesse contexto, a criopreservação de gametas, torna-se uma ferramenta importante na reprodução artificial de diversos organismos, possibilitando a

conservação da variabilidade genética e reposição dos estoques naturais através da formação de bancos de germoplasma (CABRITA et al., 2010). Com isso, propicia a proteção dos ambientes aquáticos e a conservação de espécies aquáticas nativas, fundamentais ao equilíbrio desses ambientes, tais como, o peixe Cará *Geophagus brasiliensis*.

O Cará possui ampla distribuição na América do sul, especialmente, ao longo das bacias costeiras do leste do Brasil e Uruguai (BUCKUP et al., 2007). Apesar da sua expressiva distribuição, sua conservação faz-se necessária, uma vez que, tem importante papel no ambiente aquático, tanto na cadeia trófica, servindo de presa e predador, quanto no ciclo de nutrientes, por possuir hábito detritívoro (BASTOS et al., 2011) e alterar o substrato para construir ninhos (MARDINI apud SANTOS e FONTOURA, 2000). Além disso, possui potencial na aquicultura ornamental e tem sua comercialização permitida (BRASIL, 2012), o que pode contribuir para uma futura exploração e prejuízo aos estoques naturais.

Para a criopreservação do sêmen de *G. brasiliensis*, assim como, de outras células, tecidos e embriões, a técnica de criopreservação se utiliza de substâncias que contornem os prejuízos do processo de congelamento. Estas substâncias devem ser adequadas à proteção e manutenção da integridade e viabilidade dessas estruturas, tanto durante o resfriamento e congelamento, quanto no descongelamento (KOPEIKA et al., 2007). A escolha das substâncias crioprotetoras adequadas, bem como a concentração ideal destas, é essencial, já que os crioprotetores podem apresentar toxicidade em determinadas concentrações (VIEIRA et al., 2011), causando prejuízos inerentes a própria técnica.

Deve ser considerado também, que a preservação das estruturas celulares varia de espécie para espécie e conforme a substância crioprotetora utilizada (HOLT, 2000; VIVEIROS e GODINHO, 2009; SILVA e GUERRA, 2011), sendo assim, a determinação de protocolos de criopreservação mais adequados para diferentes espécies torna-se necessário (CABRITA et al., 2001; VIVEIROS e GODINHO, 2009; SILVA e GUERRA, 2011), especialmente, para *G. brasiliensis* que, ainda não possui tal protocolo.

Crioprotetores

Os crioprotetores agem diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular (HOLT, 2000; PURDY, 2006; BIANCH et al., 2008; VIVEIROS e GODINHO,

2009; VARELA JUNIOR, et al., 2009), pois reduzem o ponto de congelação da água (THIRUMALA et al., 2006) reduzem o volume celular (MERYMAN, 1971) e interagem com íons e macromoléculas (SOJKA et al., 1990). Dessa forma, os crioprotetores conferem proteção às estruturas celulares, reduzindo os danos à membrana plasmática e organelas (HAMMERTEDT e GRAHAM, 1992; CABRITA et al., 2001) e preservando a integridade do DNA (CABRITA et al., 2005; PÉREZ-CEREZALES, 2010), permitindo com isso, o posterior uso do material celular para finalidades reprodutivas, estudo e pesquisa.

As substâncias crioprotetoras podem ser classificadas como externas (não penetrantes na célula) ou internas (penetrantes na célula) (MERYMAN, 1971; HOLT, 2000; PURDY, 2006). Os crioprotetores externos estabilizam a membrana e formam uma película protetora entre a água e os fosfolípidos da membrana, atuando também, na desidratação celular. Estes, por sua vez, são representados por macromoléculas com alto peso molecular, como açúcares complexos, como trealose e outros dissacarídeos; lipoproteínas de baixa densidade (VARELA et al., 2009), água de coco e proteínas do leite (AMMANN E PICKETT, 1987; VIVEIROS e GODINHO, 2009).

Segundo Meryman (1971), o crioprotetor externo deve possuir uma taxa de congelamento suficientemente rápida para permitir a fuga de soluto de baixo peso molecular, mas não tão rápida, de modo a produzir congelação intracelular, sendo fundamental que a célula possa restaurar o seu conteúdo normal de soluto. Os crioprotetores internos, por sua vez, podem atuar tanto interna quanto externamente, permeando a membrana e permanecendo presentes no citoplasma (MERYMAN, 1971; PURDY, 2006; SILVA e GUERRA, 2011). Dessa forma, os agentes penetrantes evitam a concentração excessiva de solução extracelular, reduzindo a desidratação a um grau tolerável e reduzem o ponto de congelação da água evitando a formação de cristais de gelo.

Os crioprotetores devem possuir como condição de uso, a penetração uniforme na célula sem a imposição de pressões osmóticas que possam, por si próprias, serem destrutivas, além de ter baixa toxicidade em concentrações necessárias à proteção celular (MERYMAN, 1971). Nesse contexto, entre essas substâncias crioprotetoras, os crioprotetores internos mais utilizados (AGUIAR et al., 2012) são os alcoóis, Glicerol (GLI) (VARELA et al., 2012a), Etileno glicol (EG) (KOPEIK, et al., 2007; VIERA et al., 2011) e o sulfóxido, o Dimetil sulfóxido

(DMSO) (MERYMAN, 1971; SOJKA et al., 1990; THIRUMALA et al., 2006; VIVEIROS e GODINHO, 2009; VARELA et al., 2012a). As amidas, Dimetilacetamida DMA (MORRIS et al., 2003; VARELA et al., 2012b), Dimetilformamida DMF e Metilformamida MF (VARELA et al., 2012b), também são utilizadas.

Entre esses crioprotetores, o Etileno glicol e o DMSO são comumente utilizados no congelamento de espermatozoides de espécies brasileiras de peixes de água doce (VIVEIROS e GODINHO, 2009; VARELA et al., 2012a), e também, em peixes de água doce exóticos como a Tilápia *Oreochromis spp.* (GODINHO et al., 2003), Carpa comum *Ciprinus carpio* (LI et al., 2013), Zebrafish *Danio rerio* (MORRIS et al., 2003; YANG et al., 2007).

O DMSO foi utilizado inicialmente para a crioproteção de glóbulos vermelhos e espermatozoides de mamíferos (LOVERLOCK e BISHOP, 1959), considerado um aditivo crioprotetor universal (MERYMAN, 1971). Possui como ação principal, a capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas substâncias sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (SOJKA et al., 1990). Desta forma, permite que após o descongelamento a célula retome seu metabolismo normal. Também, reduz a formação de cristais de gelo intracelular, por diminuir o ponto de congelamento do fluido (THIRUMALA et al., 2006), característica comum ao Etileno glicol e Glicerol, considerado bom crioprotetor (AGUIAR et al., 2012).

O Etileno glicol foi usado originalmente como líquido de resfriamento e anticongelante automotivo (CETESB, 2014) e é apontado como alternativa na criopreservação celular, sendo considerado menos tóxico que o glicerol (AGUIAR et al., 2012). Entretanto, o glicerol é comumente usado como crioprotetor, porque é capaz de impedir que a água se converta em gelo devido ao fato de baixar o ponto de congelação da água à temperaturas muito baixas (ASHCROFI, 2001). Fato este, que é reforçado pela sua produção natural, no metabolismo de insetos que se super-refrigeram a temperaturas muito baixas (ASHCROFI, 2001).

Originalmente, utilizado em ejaculados de bovinos, o glicerol teve suas propriedades crioprotetoras descobertas na década de 50 (LOVERLOCK e BISHOP, 1959; ASHCROFI, 2001), usado com sucesso na criopreservação do esperma humano pela primeira vez em 1953 (ASHCROFI, 2001), sendo utilizado desde então. Atualmente, empregado na criopreservação seminal de algumas espécies de

peixe, entre elas, o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (VARELA et al., 2012a). Entretanto não obteve sucesso, possivelmente devido a sua toxicidade em altas concentrações e baixa mobilidade através das membranas (MERYMAN, 1971).

Em decorrência disso, o glicerol pode apresentar algumas desvantagens para a manutenção da integridade celular, devido ao alto peso molecular, à alta viscosidade e pouca permeabilidade, o que pode prejudicar a integridade da membrana plasmática, comprometendo a estrutura da camada de glicocálix e o balanço energético (HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1992). Em contrapartida, o etileno glicol e o DMSO apresentam baixa toxicidade, nas concentrações necessárias à criopreservação celular, ressaltando que, a toxicidade biológica dos agentes crioprotetores está diretamente relacionada às suas respectivas concentrações (VIERA et al., 2011).

As amidas são os crioprotetores internos mais recentemente testados na preservação espermática de mamíferos, sendo incipientes os estudos com peixes (VARELA et al., 2012b). Entretanto, sua ação crioprotetora é atribuída ao baixo peso molecular e à alta permeabilidade celular, reduzindo a possibilidade de danos à membrana celular (BARTH e OKO, 1989). Seu grupo funcional amida associa-se ao hidrogênio da molécula de água através de uma união mais eficiente com a água, quando comparada, por exemplo, à ação do glicerol, promovendo a formação de micro-cristais de gelo (gel intracelular), que são benéficos, pois minimizam as criofraturas da membrana espermática (BIANCHI et al., 2008).

Estes crioprotetores, por sua vez, necessitarão ser diluídos em criodiluentes ou extensores, para serem acrescentados ao sêmen a ser preservado (HOLT, 2000; VIVEIROS e GODINHO, 2009). Segundo Purdy (2006), o diluente tem por finalidade fornecer energia, proteger de danos relacionados com a temperatura e manter um ambiente adequado para os espermatozoides sobreviverem temporariamente.

Viveiros e Godinho (2009) citam as soluções testadas como diluidores de sêmen de peixe, as soluções simples como: solução salina com 0,9% de NaCl e solução de 5% de glicose; e, a solução *Beltsville Thawing Solution* (BTS) como a mais complexa, constituída de 40 g glicose; 6,4 g Citrato de sódio di-hidratado; 1,35g Bicarbonato de sódio; 1,35g Etilenodiamino tetracetato (EDTA); 0,8g Cloreto de potássio; 0,7g antibiótico Sulfato de Gentamicina; 1L água Mili-Q; (pH 7,2 e

318mOsm/kg) (PURSEL e JOHNSON, 1975; GADEA, 2003; VARELA et al., 2012a).

Horvath e Urbanyi (2000) citam a BTS como o diluente mais utilizado em protocolo de congelamento de esperma para espécies de peixes nativos brasileiros, como: em Pirapitinga *Brycon orbignyianus* (MURGAS et al., 2004), *Leporinus obtusidens* (MURGAS et al., 2002), Curimbatá *Prochilodus lineatus* (FRANCISCATTO, et al., 2002), Piracanjuba *Brycon orbignyianus* (MARIA et al., 2006), *Brycon nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), Curimba *Prochilodus lineatus* (MILIORINI, et al., 2011), Tambaqui *Collossoma macropomum* (VARELA et al., 2012a).

Além das substâncias utilizadas no processo de congelamento, torna-se necessário atentar para a forma como este deve ser conduzido. Segundo Watson (1995), quando a célula espermática é submetida à congelação lenta, há tempo suficiente para o estabelecimento do equilíbrio entre o solvente e soluto, através da migração da água intracelular para o meio extracelular. Silva e Guerra (2011) complementam, visto que, desta maneira evita-se que ocorram rompimentos das membranas pela rápida reconstituição do volume intracelular com a reidratação.

Na criopreservação, embriões e oócitos são de difícil preservação devido à complexidade celular (MILIORINI, 2012). Preservar células e estruturas celulares a baixas temperaturas também é complexo, mas como os gametas masculinos têm apresentado maior sucesso no processo de criopreservação, estes são o foco da maioria dos estudos, inclusive deste.

Sêmen de peixe – Espermatozoide e plasma seminal

O sêmen de peixe é formado pela fração celular, os espermatozoides, e fração fluida, o plasma seminal. Este, por sua vez, é originado pelo resíduo de células de Sertoli, pelo resíduo de células espermáticas em decomposição e de sobras citoplasmáticas do processo de espermiogênese (CIERESZKO et al., 2000).

O plasma seminal contém principalmente compostos minerais e baixas concentrações de substâncias orgânicas, sendo predominantes os íons sódio, potássio e cloro, além dos íons cálcio e magnésio que também contribuem na composição do mesmo (CIERESZKO et al., 2000). Esta composição iônica é importante na regulação da motilidade espermática, na osmolaridade do plasma seminal, além do seu efeito direto na ativação espermática (BILLARD e COSSON, 1992).

Como características morfológicas, os espermatozoides da maioria dos peixes são destituídos de acrossoma, especialmente, nos peixes de água doce, sendo compensado pela presença da micrópila no córion do oócito, orifício que permite a entrada do espermatozoide para a fertilização (COSSON et al., 1999a).

A cauda, ou flagelo, pode ainda ser subdivida em colo e peças intermediária, principal e terminal, assim como nos espermatozoides de mamíferos domésticos. O colo, ou peça de conexão, representa a inserção do corpo basal do flagelo à cabeça. A peça intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice responsável pela geração de energia necessária à propulsão mótil dos espermatozoides (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Nos espermatozoides de *G. brasiliensis* o núcleo é esférico e ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica e suas mitocôndrias, esféricas, ocupam a porção inicial da peça intermediária distribuídas em duas camadas. Possuem um flagelo, com axonema de arranjo clássico de 9+2 microtúbulos e duas projeções laterais na membrana flagelar, as quais têm o início de sua formação abaixo da peça intermediária, fora do canal citoplasmático, em lados opostos do flagelo (ORTIZ, 2012).

Para o entendimento do processo de congelamento e descongelamento, assim como a ação dos crioprotetores, é necessário à realização de avaliações que verifiquem as características morfo-funcionais do espermatozoide como: motilidade, integridade de membrana, DNA e funcionalidade mitocondrial (CABRITA et al., 2001).

Motilidade espermática

Enquanto permanecem na luz testicular os espermatozoides de peixes são imóveis e inativos. A motilidade ocorre após a liberação em um meio aquoso ou, em espécies com fertilização interna, dentro do trato reprodutivo feminino, tendo tais ambientes, osmolaridades distintas em relação à luz testicular (STOSS, 1983). A ativação da motilidade também pode ocorrer pela concentração do íon potássio, este mecanismo é observado principalmente em salmões. Quando sua concentração no plasma seminal é menor que 25 mM, a motilidade é ativada, sendo maior que 40 mM, a motilidade é inibida (CIERESZKO et al., 2000).

Desta forma, em espécies ovíparas de água doce a motilidade espermática é ativada quando a osmolaridade ambiental é menor que 200 mOsm/Kg e inibida quando a osmolaridade do ambiente é maior em relação ao plasma seminal (acima de 300 mOsm/Kg) (CIERESZKO et al., 2000). Por isso, deve-se ter uma preocupação especial em relação à osmolaridade do diluente para peixes, pois este não pode ativar as células espermáticas (CHAMBEYRON e ZOHAR, 1990).

A motilidade é o fator mais utilizado para avaliar a qualidade espermática entre as espécies. É usualmente expressa pela percentagem de espermatozoides móveis em sêmen adequadamente ativado, sendo sua duração também comumente avaliada. Em peixes, pode variar de 20 a 25 segundos, como observado em trutas ou 1 hora, como observado em *Poecilia reticulata* (COSSON et al., 1999b), podendo exceder 48h em algumas espécies marinhas com fertilização interna como o *Macrozoarces americanus* (YAO et al., 1999).

Os dados de motilidade espermática informam a aptidão do organismo para a reprodução, uma vez que, sem motilidade, o espermatozoide não poderá encontrar o oócito e sem um tempo determinado de duração desta motilidade, especialmente em peixes, o espermatozoide não encontrará a micrópila do oócito aberta para a fecundação. Sendo esses, importantes parâmetros para a investigação de prejuízos causados durante a técnica de criopreservação, visto que, na utilização desta técnica pretende-se conservar gametas viáveis para utilização futura na reprodução.

A motilidade espermática pode ser avaliada com a observação de um técnico treinado através de microscopia ou, pelo sistema *computer assisted sperm analysis* (CASA). Este último permite o estabelecimento de um padrão do comportamento espermático normal em peixes, através da obtenção de dados como velocidade espermática, linearidade, balanço e frequência de batimentos da cauda dos espermatozoides (RURANGWA et al., 2001). Entretanto, nos estudos de Nascimento et al., (2010) e Viveiros et al., (2010) não houve diferença significativa entre a motilidade avaliada de forma subjetiva, por um técnico treinado e a motilidade avaliada pelo sistema CASA. Isso garante a qualidade da avaliação em laboratórios que não dispõem de recursos para aquisição de tal equipamento.

Funcionalidade mitocondrial

A energia necessária para motilidade espermática é promovida pelas mitocôndrias localizadas na peça intermediária do espermatozoide. Esta energia liberada durante reações de oxidação na cadeia respiratória é armazenada como gradiente eletroquímico capaz de conduzir a síntese de adenosina trifosfato (ATP) para ser utilizado como combustível nos processos celulares, sendo necessário para a movimentação da cauda (BARTH e OKO, 1989).

Entretanto, estudos realizados por Billard et al. 1995 concluíram que os espermatozoides de peixes ovíparos como a carpa, são carregados de ATP. Quando ativados, já possuem a quantidade de ATP necessária a serem hidrolisados durante a motilidade, sendo pequena a contribuição mitocondrial durante a fase de motilidade, mas sim, antes da mesma, subsidiando-a. Assim, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade espermática (GRAVANCE et al., 2010).

Cátions lipofílicos membrana-permeáveis, denominados de sondas, uma vez acumuladas em células vivas, organelas e lipossomos são utilizados para decifrar os mecanismos de regulação e controle da transdução energética. Estas sondas incluem aquelas que apresentam atividade óptica e fluorescente após acumulação em sistemas energizados (COSSARIZZA et al., 1993).

Sendo assim, a função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência através de sondas como Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e Mito Tracker Reed que permitem a identificação de mitocôndrias em células vivas (ARRUDA et al., 2004). Outra possibilidade corresponde à utilização da sonda JC-1 que permite a identificação de diferentes sub-populações espermáticas exibindo alta ou baixa funcionalidade mitocondrial (GRAHAM, 2001).

Integridade de Membrana celular e DNA

Dentre suas inúmeras funções relacionadas ao metabolismo celular, a integridade da membrana plasmática garante a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre o meio interno e externo (AMANN e PICKETT, 1987). Dessa forma, avaliação das membranas espermáticas pode ser um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que, as membranas são extremamente sensíveis às crioinjúrias.

Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas celulares podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento das mesmas (AMANN e GRAHAN, 1993). Na membrana espermática, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídeos, alterando seu estado funcional (HOLT et al., 1992).

Nas avaliações espermáticas, a técnica que utiliza sondas fluorescentes é importante por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI et al., 2005). Sondas fluorescentes com especificidade com ácido desoxirribonucleico (DNA) são usadas para determinar a integridade da membrana plasmática, tais como Hoechst 3358 (H258), Hoechst 33342 (H342) e SYBR- 14 (CELEGHINI et al., 2007).

As sondas fluorescentes comumente utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática são o diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídio, em combinação. Nos espermatozoides íntegros, o diacetato de carboxifluoresceína permeia a membrana plasmática e esterases intracelulares o convertem em composto fluorescente – a fluoresceína, que fica retida no citoplasma, dando a coloração verde ao gameta (GILLAN et al., 2005). O iodeto de propídio possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada.

Quanto à integridade de DNA, este quesito é fundamental para garantir o sucesso do desenvolvimento do embrião após fertilização (VARELA et al., 2012b), visto que, o aumento da fragmentação do DNA do espermatozoide observada com alguns crioprotetores podem aumentar a probabilidade de fertilização por um espermatozoide com DNA danificado (VARELA et al., 2012b). Isso pode impactar negativamente sobre as taxas de fertilização e eclosão, devido ao comprometimento do desenvolvimento embrionário (CABRITA et al., 2010; VARELA et al., 2012b).

Entretanto, Partyka et al. (2010), sugere que, a integridade do DNA se mantenha inalterada mesmo com a exposição do espermatozoide à baixas temperaturas, possivelmente, devido ao espermatozoide apresentar a cromatina fortemente enovelada, mais compacta que as demais células somáticas e espermatogênicas (espermátides, espermatócitos e espermatogônias) e protegida pela membrana nuclear.

A avaliação estrutural da cromatina espermática tem sido realizada com o uso da *acridine orange*, um corante que se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta apresenta-se íntegra; todavia quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou ao RNA, a *acridine* emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra (ARRUDA et al., 2004).

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) na criopreservação seminal

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas espontaneamente durante a respiração celular e interação com substâncias orgânicas, como também por sistema intracelular de enzimas, tal como a NADPH-oxidase (AITKEN, 1995). Quando as EROs superam a capacidade de tamponamento da célula, esta entra em estresse oxidativo, o qual pode provocar danos ao DNA, proteínas e lipídios.

Os espermatozoides possuem limitado volume de citoplasma sendo dependentes do apoio antioxidante do plasma seminal (ALVAREZ et al., 1987). Eles também possuem limitado sistema de ação enzimática antioxidante natural devido a impossibilidade de transcrever e/ou traduzir o material genético, pois o mesmo é fortemente enovelamento. Além disso, os espermatozoides são suscetíveis a peroxidação lipídica porque os lipídios da membrana são ricos em ácidos graxos poliinsaturados (JONES et al., 1979).

O peróxido de hidrogênio gerado, em contraste ao ânion superóxido, é mais estável e menos polar, podendo atravessar facilmente a membrana celular (HALLIWELL e CHIROCO, 1993). Em consequência disso, o peróxido de hidrogênio pode ser o principal responsável pelo dano oxidativo de espermatozoides *in vitro*. E a peroxidação lipídica da membrana pode ser o mecanismo de ação (AITKEN et al., 1993; AITKEN 1995). Como consequência da peroxidação lipídica, a membrana plasmática perde fluidez e integridade necessárias à manutenção do metabolismo celular e evento de fertilização (STOREY, 1997).

Dessa forma, antes do processo de criopreservação, os espermatozoides podem sofrer estresse oxidativo, e especialmente, na preparação dos mesmos para a criopreservação, que envolve a remoção e/ou diluição do plasma seminal, aumentando assim, a susceptibilidade dos espermatozoides a esse estresse. Os espermatozoides também sofrem estresse gerado pelo contato com o crioprotetor, o

qual possui elevada osmolalidade e pH, além do estresse causado pelo congelamento e descongelamento durante o processo de criopreservação (KOPEIKA et al., 2007).

Após o descongelamento pode ocorrer redução da qualidade da amostra devido à ampliação da produção de espécies reativas de oxigênio, com formação de peróxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos (AITKEN, 1995). Estes, por sua vez, danos ao espermatozoide, causando alterações na integridade e fluidez da membrana, comprometimento das interações lipídio-proteína e modificações do DNA e proteínas (HALLIWELL e CHIROCO, 1993). Sendo fundamental a avaliação dos espermatozoides neste quesito.

Avaliação por citometria de fluxo

Uma série de características da célula espermática como integridade de membrana plasmática, estrutura de cromatina, funcionalidade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, podem ser avaliadas pela citometria de fluxo.

A citometria de fluxo possibilita a contagem, classificação e isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são movidas individualmente em fluxo laminar, através de um sistema detector óptico e então, analisadas através de um software (PAPA et al., 2008).

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes tornaram possível uma análise mais pormenorizada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultraestruturais e funcionais (PAPA et al., 2008). Muitos destes ensaios usando fluocromos tem sido desenvolvidos para a utilização na microscopia de epifluorescência (PAPA et al., 2008). Entretanto, a análise microscópica de um pequeno número de espermatozóides dentro de uma população pode ser subjetiva e, geralmente, não contempla toda população espermática.

A adaptação destas avaliações para uso em citômetro de fluxo com marcadores fluorescentes pode ser uma forma rigorosa e rápida para avaliar diferentes atributos de uma amostra seminal em grande escala (GILLIAN et al., 2005), permitindo, dessa forma, a avaliação de múltiplos parâmetros espermáticos simultaneamente.

Espécie de estudo

A espécie utilizada neste estudo, o peixe *Geophagus brasiliensis* (QUOY e GAIMARD, 1824) (FISHBASE, 2014), conhecido popularmente por Cará ou Acará (SANTOS e FONTOURA, 2000; BRASIL 2012), Pearl Cichlid (BASTOS et al., 2011), Papa-terra (BRASIL, 2012), Acará-topete (REIS, et al., 2003) possui distribuição na América do sul, especialmente, ao longo das bacias costeiras do leste e sudeste do Brasil e Uruguai (BUCKUP et al., 2007, FISHBASE, 2014).

Este peixe ocorre em uma variedade de ecossistemas aquáticos como riachos, planícies de inundação, lagoas litorâneas e estuários (BASTOS et al., 2011), ocupando ambientes aquáticos lênticos de rios, lagoas e represas (SANTOS e FONTOURA, 2000). Está presente em diferentes locais ao longo da Laguna dos Patos, sistema lagunar Patos-Mirim, no sul do Brasil, como no Canal São Gonçalo, que liga a Laguna dos Patos a Mirim (BURNS et al., 2006) lagos e zonas úmidas da reserva do Taim (GARCIA, et al., 2006) também, em zona estuarina da Laguna dos Patos (GARCIA et al., 2003).

Segundo Bastos et al., (2011), o peixe *G. brasiliensis* possui hábito alimentar onívoro, alimentando-se principalmente de crustáceos, moluscos, plantas vasculares e detritos. Tendo importante papel na cadeia trófica, já que pode controlar as populações de tais organismos. Atinge tamanho máximo de 28 cm (REIS et al., 2003), apresentando comumente comprimento de 9 cm (HUGG apud FISHBASE, 2013).

A espécie vive em água doce e estuarina, em ambiente bentopelágico, e como parâmetros ideais para a mesma, a faixa de pH entre 6,5 e 7,0 (RIEDE apud FISHBASE, 2014), de temperatura entre 20 e 23°C (RIEHL e BAENSCH apud FISHBASE, 2014), possuindo certa flexibilidade quanto a esses parâmetros, visto que, habita regiões de clima temperado como a região sul do Brasil (GARCIA et al., 2003; GARCIA et al., 2006; BURNS et al., 2006).

De acordo com Santos e Fontoura (2000), a espécie possui período reprodutivo de setembro a abril, e apresenta picos reprodutivos em novembro e fevereiro, demonstrados através do aumento no índice gonadossomático, o que indica aumento no número de fêmeas maduras neste período.

Em época de acasalamento, os machos apresentam protuberância na parte superior da cabeça e coloração azul iridescente como diformismo sexual (BARBIREI et al., 1981) atingindo tamanhos maiores que as fêmeas (SANTOS e FONTOURA,

2000). Além disso, Santos e Fontoura (2000) estimam que o tamanho dos peixes na primeira maturação seja entre 8 e 9 cm.

A espécie apresenta fecundação externa, a fêmea deposita em média, 500 ovos (BUCKUP e REIS apud SANTOS e FONTOURA, 2000), em saliência do terreno (WIMBERGER, 1992) ou em ninhos construídos no fundo com profundidade média de 15 cm (MARDINI apud SANTOS e FONTOURA, 2000) em seguida o macho libera o sêmen sobre os ovos. Os ninhos são protegidos por eficiente cuidado parental, que pode durar entre 3 a 4 semanas (STIASSNY apud SANTOS e FONTOURA, 2000). A eclosão dos ovos ocorre após 96 horas de fecundados a uma temperatura de 25 °C, sendo que as larvas medem perto de 0,5 cm ao nascer (MARDINI apud SANTOS e FONTOURA, 2000).

O. G. brasiliensis está presente na lista da Instrução Normativa Interministerial que permite a sua comercialização para fins ornamentais (BRASIL 2012), o que demonstra o seu potencial para este fim. Devido a isso, sua exploração pode prejudicar os estoques naturais no futuro. Desta forma, torna-se necessária a elaboração de estudos que garantam a preservação genética e que, forneçam subsídios para a aquicultura e manutenção dos estoques naturais como a técnica da criopreservação de sêmen (GODINHO et al., 2003).

Observando-se a viabilidade da técnica de criopreservação para muitas espécies de peixes de água doce estudadas, entre elas, a Tilápia (*Oreochromis spp.*), (RANA e McANDREW, 1989; GODINHO et al., 2003), o Peixe rei (*Odontesthes bonariensis*) (LINCHTEBSTEIN, et al., 2010), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) VARELA et al., 2012b), Curimba (*Prochilodus lineatus*) (MILIORINI, 2012), Carpa (*Ciprinus carpio*) (LI et al., 2013) Zebrafish (*Danio rerio*) (MORRIS et al., 2003; YANG et al., 2007). Enfatiza-se a importância da contribuição desta pesquisa para elaboração de um protocolo de congelamento de sêmen da espécie *G. brasiliensis*. Isso possibilitará a reprodução da mesma *in vitro* e garantirá reposições futuras de estoques naturais, uma vez que a espécie *G. brasiliensis* possui relevante papel ecológico, bem como, potencial na aquicultura ornamental.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi testar a eficiência crioprotetora do DMSO, Etileno glicol e Glicerol, em diferentes concentrações, em sêmen de *G. brasiliensis*.

As referências estão de acordo com as normas da ABNT 2014, NBRs 6023, 6027, 6028, 10520, 14724.

Referências

- AGUIAR, T. D. F. et al. Princípios Básicos da Criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Vet. Brasilic**, v. 6, n.2, p. 80-93, 2012.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 97, p. 441–50, 1993.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, p. 659–668, 1995.
- ALVAREZ, J. G. et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **J Androl**, v. 8, p. 338–48, 1987.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Scienci**, v. 7, p. 145-174, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon, AO, Voss, JL. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febinger, v. 80, p. 715-46, 1993.
- ARRUDA, R. P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. **Anais**, Londrina, Brasil, 2004. P. 166-179.
- ASHCROFI, F. **A vida no limite – A ciência as sobrevivência**. Zahar, 2001. 315p.
- BARBIERI, M. C, BARBIERI, G, MARINS, M. A. Sobre a anatomia e histologia de testículo de *Geophagus brasiliensis* na reprêsa do Lobo, São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 41, n.1, p. 169-73, 1981.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Estados Unidos: Iowa State University Press, 1989. 285p.

- BASTOS, R. F. et al. Diet and food consumption of the pearl cichlid *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae): relationships with gender and sexual maturity. **Neotropic Ichthyol**, v. 9, n.4, p. 825-30, 2011.
- BIANCH, I. et al. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar sêmen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 232-38, 2008.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 22-31, 1992.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. 2012. Instrução Normativa Interministerial n. 1, de 3 de Janeiro de 2012. Estabelece normas, critérios e padrões para a exploração de peixes nativos ou exóticos de águas continentais com finalidade ornamental ou de aquariofilia. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 3, Seção I, p. 26-42, 04 Jan. 2012.
- BUCKUP, P. A.; REIS, R. Conheça nossos peixes. Natureza em revista 1985; 10: 22-29. In: SANTOS, G. O, FONTOURA, N. P. Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. (TELEOSTEI — CICHLIDAE). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** - Seção: Recursos Naturais Renováveis, v. 6, n. 1, p. 131-44, 2000.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195p.
- BURNS, M. D. M. et al. Evidence of habitat fragmentation affecting fish movement between the Patos and Mirim coastal lagoons in southern Brazil. Sociedade Brasileira de Ictiologia. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 69-72, 2006.
- CABRITA, E; ANEL, L.; HERRAÉZ, M. P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 623–35, 2001.
- CABRITA, E. et al. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. **Cryobiology**, v. 50, n. 2, p. 144 –53, 2005.
- CABRITA, E. et al. Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **J Appl Ichthyol**, v. 26, p. 623–635, 2010.
- CARREIRA, J. T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, cromatina, potencial mitocondrial e produção de embriões**

- invitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal.** 2008. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Uso de CMXROS e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2005, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2005, v. 33, p.321-321.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-88, 2007.
- CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Emergências Químicas. Manual de Produtos Químicos. Lista completa de produtos químicos. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/emergencias-quimicas/258-manual-de-produtos-quimicos>> Acesso em: 20 mai. 2014.
- CHAMBEYRON, F.; ZOHAR, Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead Seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, v. 345-52, 1990.
- CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in Aquatic Species**. World Aquaculture Society, Baton Rouge: Louisiana, 2000. p. 20-48.
- COSSARIZZA, A. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemistry Biophysic Research Communications**, v. 197, p. 40-45, 1993.
- COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: The Male Gamete. v. 16, p. 161-86, 1999a.
- COSSON, J. F.; PONS, J. M.; MASSON, D. Effects of forest fragmentation on frugivorous and nectarivorous bats in French Guiana. **Journal of Tropical Ecology**, v. 15, p. 515-34, 1999b.

- ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602p.
- FISHBASE. A Global Information System on Fishes. Disponível em:
<<http://www.fishbase.org/summary/Geophagus-brasiliensis.html>> Acesso em: 2014.
- FRANCISCATTO, R. T. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 213-15, 2002.
- GADEA, J. Review: Semen extender used in the artificial insemination of swine. **Spanish J Agric Res**, v. 1, p. 17-27, 2003.
- GARCIA, A. M. et al. Spatiotemporal variation in shallow-water freshwater fish distribution and abundance in a large subtropical coastal lagoon. **Environmental Biology of Fishes**, v. 68, p. 215-28, 2003.
- GARCIA, A. M. et al. Checklist comparison and dominance patterns of the fish fauna at Taim Wetland, South Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 261-68, 2006.
- GILLIAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-57, 2005.
- GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação do Sêmen de Tilápia-Nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, Soluções Ativadoras e Refrigerador Criogênico. **Rev Bras Zootec**, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 302-305, 2001.
- GRAVANCE, C. V. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-703, 2000.
- HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
- HALLIWELL, B.; CHIROCO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **Am J Clin Nutr**, v. 57, p. 715-25, 1993.
- HAMMEREDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.
- HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E. *The Diversity of Fishes*. 4th ed. United States of America: Blackwell Science, 1999. 528p.

- HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in RAM spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Repro Sci**, v. 62, p. 3–22, 2000.
- HORVATH, A.; URBANYI, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 317–24, 2000.
- HUGG, DO. Freshwater and estuarine fishes of North America. MAPFISH georeferenced mapping database. Life Science Software. 1996. In: FISHBASE. Disponível em:
<<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=4751&genusname=Geophagus&speciesname=brasiliensis&AT=Geophagus+brasiliensis&lang=English>> Acesso em: Nov. 2013.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. **Diagnóstico Geral das Práticas de Controle Ligadas a Exploração, Captura, Comercialização, Exportação e Uso de Peixes para fins Ornamentais e de Aquarofilia**, 2008. Disponível em:
<http://www.bettebrasil.com.br/downloads/diagnostico_do_ibama.pdf> Acesso em: Nov. 2013.
- JONES, R.; HAMILTON, D. W.; FAWCETT, D. W. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. **Am J Anat**, v. 156, n.3, p. 373–400, 1979.
- JUNK, W. J. *et al.* Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. **Aquatic Conservation: Mar Freshw Ecosyst**, v. 24, p. 5-22, 2014.
- KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J.; ZHANG, T. Cryoperservation of Fish Sperm. In: DAY, J. G.; STANCEY, G. N. **Cryopreservation and freeze-Drying Protocols**. Serie: Methodos in Molecular Biology. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007, p. 203-217.
- LI, P. *et al.* Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm induces protein phosphorylation in tyrosine and threonine residues. **Theriogenology**, v. 80, p. 84–89, 2013.

- LINCHTENTEIN, G.; ELÍSIO, M.; MIRANDA, L. A. Development of sperm cryopreservation techniques in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, v. 306, p. 357-61, 2010.
- LIVENGOOD, E. J.; CHAPMMAN, F. A. The Ornamental Fish Trade: An Introduction with Perspectives for Responsible Aquarium Fish Ownship. University of Florida – IFAS Extension, 2011. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FA/FA12400.pdf> Acesso em: Nov. 2013.
- LOVERLOCK, J. E.; BISHOP, M. W. H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, **Nature**, v. 183, p. 1394–395, 1959.
- MARDINI, C. V. Desova em confinamento do cará manteiga, *Geophagus brasiliensis* e comentários sobre a espécie. Porto Alegre: Departamento de Pesca, Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, 1983. In: SANTOS, G. O.; FONTOURA, N. P. Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. (TELEOSTEI — CICHLIDAE). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** - Seção: Recursos Naturais Renováveis, v. 6, n. 1, p. 131-44, 2000.
- MARIA, N. A. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.
- MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 8, p. 173–183, 1971.
- MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba *Prochilodus lineatus* sperm damages after **Cryopreservation Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-87, 2011.
- MILIORINI, A. B. **Resfriamento e congelamento de Embriões de Dourado (*Salminus brasiliensis*), Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e Piapara (*Leporinus obtusidens*)**. 2012. 139f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2012.
- MORRIS, J. P. et al. Zebrafish sperm cryopreservation with N, N – dimethylacetamide. **Biotechnology**, v. 35, p. 956-68, 2003.
- MURGAS L. D. S. et al. Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1361-365, 2004.

- MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 211-13, 2002.
- NASCIMENTO, A. F. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2, p. 324-29, 2010.
- OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1509-515, 2007.
- ORTIZ, R. J. Características espermáticas na subfamília Cichlinae (Perciformes: Cichlidae) e suas implicações filogenéticas. 2012. 77f. Tese (Doutorado em Biologia geral aplicada) – Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP, 2012.
- PAPA, F. O. et al. A. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. Biotecnologia da Reprodução de Bovinos In: 3º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. Londrina – PR, 2008, p.78-94.
- PARTYKA A.; NIZANSKI, W.; LUKASZEEWICZ, E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl sêmen by flow cytometry. **Theriogenology**, v.74, p. 1019-1027, 2010.
- PÉREZ-CEREZALES, S. et al. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. **Reproduction**, v. 139, p. 989–97, 2010.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-25, 2006.
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 99-102, 1975.
- RANA, K. J.; McANDREW, B. J. The Viability of Cryopreserved Tilapia Spermazoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 76, p. 335-45, 1989.
- REIS, R. E. et al. Check List of The Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p.
- RIED, K. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R & D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature

- Conservation, Bonn, Germany, 2004. In: FISHBASE. Disponível em:<
<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=4751&genusname=Geophagus&speciesname=brasiliensis&AT=Geophagus+brasiliensis&lang=English>> Acesso em: Nov. 2013.
- RIEHL, R.; BAENSCH, H. A. Aquarien Atlas. Band. 1. Melle: Mergus, Verlag für Natur-und Heimtierkunde, Germany, 1991. In: FISHBASE. Disponível em:<
<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=4751&genusname=Geophagus&speciesname=brasiliensis&AT=Geophagus+brasiliensis&lang=English>> Acesso em: Nov. 2013.
- RURANGWA, E. et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*), **Theriogenology**, v. 55, p. 751-69, 2001.
- SANTOS, G. O.; FONTOURA, N. P. Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. (TELEOSTEI — CICHLIDAE). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** - Seção: Recursos Naturais Renováveis, v. 6, n. 1, p. 131-44, 2000.
- SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Rev Bras Rep Anim**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.
- SOJKA, E. J.; KIMMICK, S. V. B.; CARISON, G. P. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. **Am Assoc of Equine Practit**, v. 36, p. 683-90, 1990.
- STISSNY, M. L. J. Cichlidae are different! Tropical fish hobbyist Magazine, 1993, March: 84-98. In: SANTOS, G. O.; FONTOURA, N. P. Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. (TELEOSTEI — CICHLIDAE). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** - Seção: Recursos Naturais Renováveis, v. 6, n. 1, p. 131-44, 2000.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: **Fish Physiology**, cap. 6, v. IX, HOAR, W.; RANADALL, D.; DONALDSON, E. New York: Academic Press, 1983.
- STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Mol Human Reprod**, v. 3, p. 203–13, 1997.

- THIRUMALA, S. et al. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, v. 66, p. 964-73, 2006.
- VARELA JUNIOR, A. S. et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 323-327, 2009.
- VARELA JUNIOR, A. S. et al. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do Dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de Tambaqui *Colossoma macropodum*. **Atlântida**, v. 34, p. 129-37, 2012a.
- VARELA JUNIOR A. S. et al. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropodum*. **Theriogenology**, v. 78, p. 244-51, 2012b.
- VIEIRA, S. C. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Sci Vet**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.
- VIVEIROS, A. T.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiol and Biochem**, v. 35, p.137-50, 2009.
- VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v. 74, n. 40, p. 551-56, 2010.
- YANG, H. et al. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in Zebrafish *Danio rerio*. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 128-36, 2007.
- YAO, Z.; RICHARDSON, G.; CRIM, L. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture**, v. 174, p. 183-93, 1999.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reprod Fert Dev**, v. 7, p. 871-91, 1995.
- WIMBERGER, P. H. Plasticity of fish body shape. The effects of diet development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces:Cichlidae). **Biological Journal of Linnean Society**, v. 45, p. 197-218, 1992.

CAPÍTULO 1

“Manuscrito a ser submetido à revista Theriogenology”.

**DIMETIL SULFÓXIDO, ETILENO GLICOL E GLICEROL NA
CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE CARÁ *Geophagus brasiliensis*.**

Submetido à revista Theriogenology.

**DIMETIL SULFÓXIDO, ETILENO GLICOL E GLICEROL NA
CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE CARÁ *Geophagus brasiliensis*.**

JS Caldas¹, CD Corcini², EF Silva¹, TF Cardoso¹, JC Silva¹, IB Acosta¹, JP Alves¹,
MRC Figueiredo², RD Jardim¹, AS Varela Jr.^{1*1}.

¹ Reprodução Animal Comparada – RAC, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

²ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS,
Brasil.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo, testar a eficiência crioprotetora do Dimetil sulfóxido (DMSO), Etileno glicol (EG) e Glicerol (GLI), em diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20%), em sêmen de *Geophagus brasiliensis*. Os machos (n=12) foram obtidos de pescadores profissionais da Laguna dos Patos, tiveram seu sêmen coletado por massagem abdominal e diluído (1:9 v/v) em *Betsville Thawing Solution* para avaliação dos parâmetros espermáticos. As amostras seminais foram diluídas nos diferentes tratamentos com crioprotetores DMSO, EG e GLI nas concentrações (5, 10, 15 e 20%). As amostras foram então congeladas em *dry shipper* e posteriormente armazenadas em botijão de Nitrogênio líquido à -196°C, por no mínimo 15 dias. Posteriormente, descongeladas em banho-maria a 37° C por 8 segundos, sendo realizadas as análises espermáticas para avaliação das organelas

*¹ Corresponding author: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Rio Grande, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. E-mail:

antoniovarela@furg.br

(membrana, mitocôndria, DNA) por citometria de fluxo, e avaliada a motilidade (taxa e tempo) em microscópio de contraste de fases. Os resultados foram avaliados estatisticamente no programa Statistix 9.0 (2008). Os tratamentos com BTS, DMSO e EG, nas concentrações de 5%, não diferiram na quantidade de ERO ($P>0.05$). Os tratamentos com DMSO 10, 15 e 20% obtiveram os melhores resultados de integridade de membrana ($P<0.05$). A Funcionalidade mitocondrial foi semelhante nos grupos com DMSO 10 e 15% e EG 5% ($P>0,05$). Todos os tratamentos mantiveram a integridade do DNA ($P>0,05$). O DMSO 10% apresentou melhores médias de motilidade (taxa e tempo), sendo essas de 24% e de 160 segundos. O DMSO 10% foi o tratamento mais eficiente na criopreservação seminal de *G. brasiliensis*.

Palavas-chave: Cará, peixe, reprodução, espermatozoide, crioprotetor, BTS.

INTRODUÇÃO

O Cará *Geophagus brasiliensis* possui ampla distribuição na América do sul, especialmente ao longo das bacias costeiras do leste do Brasil e Uruguai [1]. Esta espécie possui importante papel nos ecossistemas aquáticos, tanto na cadeia trófica, servindo de presa e predador, quanto no ciclo de nutrientes, por possuir hábito detritívoro [2] e alterar o substrato para construir ninhos [3]. Além disso, possui potencial na aquicultura ornamental e tem sua comercialização permitida [4], o que pode contribuir para uma futura exploração e prejuízo aos estoques naturais.

Em decorrência disso, a criopreservação do sêmen de *G. brasiliensis* pode contribuir para a formação de um banco genético que possibilite a reprodução *in vitro* e a reposição dos estoques naturais, conservando a espécie. Desta forma, para a criopreservação de sêmen, assim como, de outras células, tecidos e embriões, a técnica de criopreservação se utiliza de substâncias que contornem os prejuízos do

processo de congelamento. Estas substâncias devem ser adequadas à proteção e manutenção da integridade e viabilidade dessas estruturas, tanto durante o resfriamento e congelamento, quanto no descongelamento [5].

A escolha das substâncias crioprotetoras adequadas, bem como a concentração ideal destas, é essencial, já que os crioprotetores podem apresentar toxicidade em determinadas concentrações [6], causando prejuízos inerentes à própria técnica. Deve ser considerado também, que a preservação das estruturas celulares varia de espécie para espécie e conforme a substância crioprotetora utilizada [7,8]. Desse modo, a determinação de protocolos de criopreservação mais adequados para diferentes espécies torna-se necessário [8], inclusive para *G. brasiliensis* que ainda não possui tal protocolo.

Dentre os crioprotetores mais conhecidos, o Etileno glicol e o DMSO são comumente utilizados no congelamento de espermatozoides de espécies nativas brasileiras de peixes de água doce [8, 9], e também, em peixes de água doce exóticos como a Tilápia *Oreochromis spp.* [10]. O glicerol é comumente utilizado na criopreservação de peixes marinhos [11], também testado na criopreservação seminal de alguns peixes de água doce, como o Tambaqui *Colossoma macropomum* [9] e o Dourado *Salmonius brasiliensis* [12].

Observando-se a viabilidade da técnica de criopreservação para algumas espécies de peixes de água doce, entre elas: a Tilápia *Oreochromis spp.* [13], Peixe rei *Odontesthes bonariensis* [14], Tambaqui *Colossoma macropomum* [9,15], Dourado *Salmonius brasiliensis* [12], Curimba *Prochilodus lineatus* [16]. E a necessidade da elaboração de protocolo de congelamento específico para *G. brasiliensis*. O objetivo do presente estudo foi testar a eficiência crioprotetora do

Dimetil sulfóxido, Etileno glicol e Glicerol, em diferentes concentrações, para o sêmen de *G. brasiliensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais (n=12) utilizados possuíam tamanho médio de 15 cm e foram adquiridos na época reprodutiva, entre setembro a abril [17] de pescadores profissionais da Laguna dos Patos, sendo oriundos do Arroio do Arraial, na região da Quitéria, Municípios de Rio Grande – RS.

As análises da qualidade seminal foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul, Brasil. Todas as substâncias químicas utilizadas foram provenientes da Sigma Chemical Company® (St. Louis, MO – USA).

Coleta e avaliação do sêmen (pré-congelamento)

O sêmen foi coletado do peixe *in situ*, por meio de massagem abdominal, registrando-se o volume coletado, tomando-se o cuidado de evitar a contaminação por fezes e/ou urina, a fim de não ativar os espermatozoides, como recomendado por Godinho *et al.*, Rana e McAndrew [10, 13]. Após a coleta foi ao sêmen, o diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS), pH 7,2 e osmolalidade 318mOsm/Kg, na proporção de 1:9 (v/v), e encaminhado ao laboratório na temperatura de 4°C em período de no máximo 30 minutos.

Antes da criopreservação, cada amostra seminal foi avaliada, por um único observador, quanto à motilidade espermática, descartando amostras que não apresentavam motilidade acima de 80% [18] em 10 segundos após a ativação com água destilada. A motilidade foi avaliada colocando-se 2 µL de sêmen e 20 µL de

água destilada em lâmina sob lamínula, em microscópio óptico de contraste de fase [15]. Para avaliar o tempo de motilidade, foi mensurado o tempo desde a ativação até a parada total da movimentação espermática (10 segundos) [8].

Criopreservação seminal

Este congelamento contou com 13 tratamentos, entre eles, um tratamento contendo apenas solução BTS (pH 7,2 e 318mOsm/Kg) e os demais contendo as diferentes soluções crioprotetoras. Cada solução crioprotetora foi constituída de solução base BTS com adição ao respectivo crioprotetor, Dimetil sulfóxido, Etileno glicol e Glicerol nas concentrações de 10, 20, 30 e 40%, sendo que após a diluição final o diluente apresentou 5, 10, 15 e 20% de cada crioprotetor, com parâmetros de pH e osmolalidade (Tabela 1).

O sêmen de cada animal (n = 12) foi aliquoteado em tubos cônicos de 1,5 mL, um tubo para cada tratamento, sendo adicionada a respectiva solução crioprotetora em cada tubo, na proporção de 1:1 (v/v) (sêmen+BTS/solução crioprotetora). Deste conteúdo, foram utilizados 200 µL no envase de cada palheta, sendo envasadas duas palhetas com capacidade de 250 µL e acondicionadas nas *racks* para, em seguida, serem resfriadas em *dry shipper*.

As palhetas permaneceram por dois minutos a 24 °C entre o processo de envase e acondicionamento no canister de um botijão do tipo *dry shipper* (Taylor-Wharton, modelo CP 300), com vapor de nitrogênio, sendo congeladas de acordo com Taitson *et al.*, [19]. E, permaneceram por 2 horas no *dry shipper*, sendo finalmente transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (MVE, modelo CP-34), ficando armazenadas por no mínimo 15 dias à -196 °C.

Descongelamento seminal

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 8 segundos, e seu conteúdo foi diluído em 200 µL de BTS (1:1, v/v), na temperatura de 22° C, em tubos cônicos de 1,5 mL, sendo posteriormente analisadas quanto à motilidade espermática, tempo de latência, funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e DNA e espécies reativas de oxigênio (ERO).

As avaliações de motilidade espermática (taxa e tempo) foram realizadas conforme descrito para o sêmen fresco, sendo que as avaliações de funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana, DNA e ERO foram analisadas por citometria de fluxo.

Análise por citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo foi usado o aparelho Attune Acoustic Focusing Cytometer ® (Applied Biosystems) com laser azul (Argônio 488 nm) e laser violeta (UV 405 nm). A obtenção dos dados ocorreu através do software Attune ® Cytometric Software version 2.1. Para a detecção de populações de células espermáticas, na avaliação de funcionalidade de mitocôndria, integridade de membrana e DNA e espécies reativas de oxigênio (ERO) foram coradas com Hoechst 33342 que marca o DNA e a população foi detectada pelo fotomultiplicador (PMT) VL1 (450/40 nm), sendo identificada em gráficos de dispersão, tamanho das unidades eventuais e marcação de DNA [20]. Foram analisados 10.000 eventos por amostra, a uma taxa de fluxo de 100 µL / segundo.

Integridade da membrana plasmática

A integridade de membrana dos espermatozoides foi avaliada pela combinação de sondas fluorescentes de Diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP) [9]. Uma alíquota de 5 µL de solução de trabalho contendo os

corantes acima citados (DCF - 20 μM e IP - 7,3 μM), tampão fosfato salina (PBS), e Hoechst 33342 (16,2 μM), foi adicionada a uma alíquota de 5 μL de sêmen. Após 5 minutos a temperatura ambiente as amostras foram diluídas em 500 μL de PBS para efetuar a leitura no citômetro.

Dessa forma, os espermatozoides foram classificados como não lesados (DCF + / IP-), e lesados (DCF + / IP +; DCF-/IP +; DCF-/IP-) [21,22].

Funcionalidade mitocondrial

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada com coloração fluorescente Rhodamina 123 [23], que cora as mitocôndrias com funcionalidade alta. Desse modo, o alto potencial eletroquímico é emitindo pela fluorescência mais verde, sendo detectada pelo fotodetector BL1 (530/30 nm). Os espermatozoides foram classificados com alta funcionalidade das mitocôndrias (alta de fluorescência, maior acúmulo de rhodamina) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência, menor acúmulo de rhodamina) [22].

A solução de trabalho foi constituída de PBS, Hoechst 33342 (16,2 μM) e Rhodamina 123 (13 μM) foi adicionada a uma alíquota de 5 μL de sêmen, espermado-se 5 minutos a temperatura ambiente e após foi diluído em 500 μL de PBS para efetuar a leitura no citômetro.

A integridade do DNA

A integridade do DNA foi mensurada pelo ensaio de estrutura de cromatina (SCSA). Para esta avaliação, foi adicionada a uma alíquota de 5 μL de sêmen, TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2) e o Triton (Triton X-100 0,1%) (v / v), com intervalo de 30 segundos e adicionado o alaranjado de acridina

apenas no instante da leitura, adicionando-se 30 segundos após, 500 µl de PBS para fazer a leitura no citômetro.

Os resultados da citometria de fluxo foram expressos como % DFI (do inglês índice total de fragmentação do DNA que trata da relação fluorescência vermelha/fluorescência total - verde e vermelha), obtidos nos detectores BL1 (fluorescência verde) e BL3 (fluorescência vermelha) [24].

Avaliação de ERO

Nesta avaliação utilizou-se o corante fluorescente 2'7' diclorofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA), que emite fluorescência verde quando oxidados por ERRO intracelular, a qual é detectada pelo fotodetector BL1 (530/30 nm). A solução de trabalho foi constituída de PBS, H₂DCF-DA (1,0 mM) e Hoechst 33342 (16,2 µM). Nesta análise foi utilizada a mediana da intensidade de fluorescência verde [25].

Análise Estatística

Neste trabalho, foram gerados os dados descritivos (médias, erro padrão das médias) de cada uma das variáveis dependentes dos tratamentos: motilidade espermática (taxa e tempo), funcionalidade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, integridade de membrana e DNA.

Para todas essas variáveis dependentes foi realizada a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Nesta análise as variáveis apresentaram distribuição não paramétrica. Dessa forma, foram normalizadas pela função *arcsen*. A comparação entre tratamentos ocorreu pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de LSD (mínima diferença significativa). Além disso, foram realizados testes de correlação de *Pearson*. As diferentes concentrações de cada um dos crioprotetores

(DMSO, Etileno glicol e Glicerol) foram consideradas variáveis independentes. Todas as análises foram realizadas no programa Statistix 9.0 (2008).

RESULTADOS

Nos tratamentos com DMSO (Tabela 2), nas concentrações 10, 15 e 20% foi observado os melhores resultados em relação à integridade da membrana plasmática ($P < 0,05$). Quanto à integridade de DNA, esta foi mantida em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre os mesmos ($P > 0,05$) (Tab. 2).

Em relação à Funcionalidade de Mitocôndria, novamente, o DMSO 10% obteve o melhor resultado ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos, sem diferir estatisticamente da concentração de 15% do mesmo grupo e da concentração de 5% de etileno glicol.

Na motilidade espermática (Tabela 3), o tratamento com DMSO 10% obteve melhores resultados ($P < 0,05$), apresentando taxa de motilidade média de 24%. Quanto ao tempo médio de motilidade o DMSO 10% não diferiu estatisticamente do DMSO 5%, sendo as duas melhores combinações para estes parâmetros.

Por fim, acerca da produção de ERO, o tratamento apenas com BTS (sem crioprotetor) não diferiu estatisticamente do Etileno glicol 5% e DMSO com 5%, entretanto foi maior que os demais tratamentos ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

A utilização de diferentes crioprotetores modifica o pH e a osmolalidade, o que pode também prejudicar a viabilidade celular. Eles devem apresentar hiperosmolaridade para que interajam e estabilizem as membranas celulares, atuando como tampão salino no combate aos efeitos deletérios das altas concentrações de eletrólitos nas células desidratadas [26].

Salomon e Maxwell [27] sugerem que, para o sucesso da criopreservação seminal, os crioprotetores devem apresentar osmolalidade e pH adequados a boa capacidade de tamponamento, conferindo proteção à lesão criogênica. Desta forma, para esta espécie a célula espermática deve ser submetida no processo de congelamento a um diluente com um pH mais alcalino (8,6) e uma osmolalidade na faixa de 1868 a 2773 mOsm/Kg por ter sido melhor conservado as características seminais. Quando o sêmen de *G. brasiliensis* foi diluído em diluente com pH na faixa de neutralidade e osmolalidade de 318mOsm/Kg ocorreu uma baixa viabilidade celular após o processo de congelamento e descongelamento.

Os resultados favoráveis obtidos com DMSO, especialmente, nas concentrações 10, 15 e 20%, para integridade de membrana celular e 10 e 15% para funcionalidade mitocondrial, provavelmente tenham ocorrido pela redução da formação de cristais de gelo intracelular [28]. Uma combinação ou interação com carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas substâncias sem alterar de forma irreversível a configuração molecular [29], pode ter sido fundamental para a manutenção do metabolismo espermático.

O tratamento com DMSO 10% também resultou em melhores resultados de motilidade, destacando-se dos demais tratamentos como o mais eficiente na preservação da viabilidade celular. A integridade de membrana resultou em uma correlação positiva com a funcionalidade de mitocôndria ($p < 0,05$; $r^2 = 33$), tempo de motilidade ($p < 0,05$; $r^2 = 31$) e taxa de motilidade ($p < 0,05$; $r^2 = 33$). Enquanto que, a funcionalidade de mitocôndria resultou em uma correlação positiva com o tempo de motilidade ($p < 0,05$; $r^2 = 60$) e a taxa de motilidade ($p < 0,05$; $r^2 = 63$).

Neste sentido observa-se que, uma maior integridade de membrana e uma maior funcionalidade mitocondrial possuem correlação com uma maior motilidade.

Assim, o DMSO ao proteger a membrana, a qual faz permeabilidade seletiva, proporciona o fornecimento de substratos energéticos (exe. glicose) para a mitocôndria produzir energia (ATP) o que leva a ocorrência da motilidade [30], possibilitando, com isso, a capacidade fertilizante do espermatozoide.

Todos os grupos apresentaram índices totais de fragmentação de DNA semelhantes e inferiores a 5%, sugerindo que a integridade do DNA foi mantida em todos os tratamentos, mesmo no tratamento sem crioprotetor. Resultado este, que coincide com a hipótese de Partyka *et al.* [31], o qual sugere que, possivelmente devido o espermatozoide apresentar a cromatina fortemente enovelada, mais compacta que as demais células somáticas e espermatogênicas (espermátides, espermátócitos e espermatogônias) e estando envolvida pela membrana nuclear, o que pode conferir proteção. E, com isso, garantir o sucesso do desenvolvimento do embrião após fertilização, mesmo com sêmen criopreservado [32].

Em se tratando da formação de ERO, o tratamento de BTS sem crioprotetor foi obtido valor mais elevado não diferindo estatisticamente de EG e DMSO na concentração 5%, refletindo a necessidade da utilização de crioprotetores penetrantes com osmolalidade e pH adequados na criopreservação [27]. Visto que, a geração excessiva de ERO, decorrente da preparação para a criopreservação, pela diluição do sêmen e contato com o crioprotetor, além do estresse causado pelo congelamento e descongelamento [5], podem ocasionar o estresse oxidativo que compromete a qualidade e capacidade fertilizante do gameta [33].

O tratamento com Glicerol 5% comparado aos demais tratamentos produziu resultados satisfatórios para funcionalidade de mitocôndria, ERO, integridade de membrana e DNA, apesar de inferiores aos tratamentos de DMSO. Isso demonstra que, possivelmente, a utilização de menores concentrações desta substância pode

refletir em resultados mais elevados concordando que o glicerol pode ser tóxico em concentrações elevadas [6, 34] podendo prejudicar a integridade de membrana, devido o comprometimento da camada de glicocálix e o balanço energético [34].

Os resultados deste estudo demonstraram que o DMSO na concentração de 10% com solução base de BTS, foi o crioprotetor mais eficiente na criopreservação seminal de *G. brasiliensis*, mantendo a viabilidade celular e conferindo melhores taxas e tempos de motilidade. Fato que confirma o resultado obtido para *Leporinus obtusidens* [35], Tambaqui *Colossoma macropodum* [9] que sugerem o DMSO a 10% como um bom meio para a conservação do sêmen. De acordo com Viveiros e Godinho [8] o DMSO, nas concentrações de 5 a 15% é o mais efetivo na crioproteção dos espermatozoides de peixes nativos brasileiros.

Por fim, os crioprotetores Etileno glicol e Glicerol, na maioria de suas concentrações testadas, não apresentaram resultados satisfatórios frente às análises espermáticas de *G. brasiliensis*, possivelmente, devido a não apresentarem parâmetros de pH e osmolalidade adequados ao tamponamento e proteção para as células espermáticas desta espécie.

CONCLUSÃO

O DMSO na concentração de 10% com solução base de BTS é o crioprotetor mais eficiente na criopreservação seminal de *G. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

- [1] Buckup, PA, Menezes, NA, Ghazzi, MS. Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.
- [2] Bastos, RF, Condini, MV, Varela Junior, AS, Garcia, AM. Diet and food consumption of the pearl cichlid *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae):

relationships with gender and sexual maturity. *Neotropical Ichthyology* 2011; 9 (4): 825-30.

[3] Mardini, CV. Desova em confinamento do cará manteiga, *Geophagus brasiliensis* e comentários sobre a espécie. Porto Alegre: Departamento de Pesca, Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, 1983. In: Santos, GO, Fontoura, NP. Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha - Seção: Recursos Naturais Renováveis*, 2000; 6 (1):131-44.

[4] Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2012. Instrução Normativa Interministerial N°1, de 3 de Janeiro de 2012, Estabelece normas, critérios e padrões para a exploração de peixes nativos ou exóticos de águas continentais com finalidade ornamental ou de aquariofilia. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, N°3, p. 26-42, 04 de janeiro. Seção I.

[5] Kopeika, E, Kopeika, J, Zhang, T. Cryopreservation of Fish Sperm. In: JG Day, Stancey, GN. *Cryopreservation and freeze-Drying Protocols*. Serie: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007, p. 203-217.

[6] Meryman, HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971; 8: 173–183.

[7] Holt, WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Repro Sci* 2000; 62: 3–22.

[8] Viveiros, A. T.; Godinho, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol and Biochem* 2009; 35: 137–50.

[9] Varela Junior AS, Corcini CD, Streit Jr DP, Rizzoto G, Jardim RD, Lucia Jr T, et al. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do Dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de Tambaqui *Colossoma macropodum*. *Atlântida* 2012; 34: 129-37.

- [10] Godinho, HP, Amorim, VMC, Peixoto, MTD. Criopreservação do Sêmen de Tilápia-Nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, Soluções Ativadoras e Refrigerador Criogênico. Rev Bras Zootec 2003; 32 (6): 1537-543.
- [11] Suquet, M, Dreanne, C, Fauvel, C, Cosson, J, Billard, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Res 2000; 31: 231-43.
- [12] Viveiros, ATM, Oliveira, AV, Maria, NA, Orfão, LH, Souza, JC. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. Arq Bras Med Vet Zootec, 2009; 61 (4): 883-89.
- [13] Rana, KJ, McAndrew, BJ. The Viability of Cryopreserved Tilapia Spermatozoa. Aquaculture, Amsterdam, 1989; 76: 335-45.
- [14] Linchtenstein, G, Elisio M, Miranda, LA. Development of sperm cryopreservation techniques in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture 2010; 306: 357-61.
- [15] Maria, AN, Azevedo, HC, Santos JP, Carneiro, PCF. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. Zigote 2011; 5: 1-5.
- [16] Miliorini, AB, Murgas, LDS, Rosa, PV, Oberlender, G, Pereira, GJM, Costa, DV. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after Cryopreservation Aquaculture Research, 2011; 42: 177-87.
- [17] Santos, GO, Fontoura, NP. Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. (TELEOSTEI — CICHLIDAE). Pesquisa Agropecuária Gaúcha - Seção: Recursos Naturais Renováveis. 2000; 6 (1):131-44.
- [18] Soresen Junior, AM. A laboratory Manual for Animal Reproduction. 4th. ed. Massachusetts: American Press, 1979.

- [19] Taitson, PF, Chami E, Godinho, HP. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 283–91.
- [20] Petrunkina AM, Waberski D, Bollwein H, Sieme H. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology* 2010; 73: 995-1000.
- [21] Fernández-Gago, R, Domínguez, JC, Martínez-Pastor, F, Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study *Theriogenology* 2013; 80: 400–10.
- [22] Gillan, L, Evans, G., Maxwell, WMC . Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential *Theriogenology* 2005; 63: 445–57.
- [23] He, S, Woods, LC. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 2004; 48: 254–62.
- [24] Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
- [25] Domínguez-Rebolledo, AE, Martínez-Pastor, F, Bisbal, AF, Ros-Santaella, JL, García-Álvarez, O, Maroto-Morales, A, et al., Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim*, 2011; 46: 393–403.
- [26] De Leeuw, FE, Colenbrander, B, Verkleij, AJ, The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*. Suppl.1 1990; 95-104.

- [27] Salomon, SA, Maxwell, WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77-111.
- [28] Thirumala, S, Campbeell, WT, Vicknair, MR, Tiersch, TR, Devireddy, RV. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology* 2006; 66: 964-73.
- [29] Sojka, EJ, Kimmick, SVB, Carison, GP. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. *Am Assoc of Equine Practit* 1990; 36; 683-90.
- [30] Cosson, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish permatozoa. *Aquaculture International* 2004; 12: 69–85.
- [31] Partyka A, Nizanski W, Lukaszewicz E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl sêmen by flow cytometry. *Theriogenology* 2010; 74: 1019-1027.
- [32] Cabrita, E, Sarasquete, C, Martínez-Páramo, S, Robles, V, Beirão, J, Pérez-Cerezales, S, Herráez, MP. Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol* 2010; 26: 623–635.
- [33] Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 659–668.
- [34] Hammerstedt, RH, Graham, JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992; 29 (1): 29-38.
- [35] Murgas L.D.S., Miliorini A.B., Barbosa M.O., Franciscatto R.T. & Maria A.N. Viabilidade do sêmen de piapara (*Leporinus obtusidens*), resfriado a 4°C, empregandose diferentes diluentes. In: *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura* (ed. by E.C. Urbinati & J.E.P. Cyrino, orgs.) Jaboticabal: AQUABIO 2002; 2: 117-125.

ANEXO

Tabela 1 – Osmolalidade e pH das soluções crioprotetoras utilizadas.

Solução Crioprotetora	pH	Osmolalidade (mOsm/Kg)*
BTS	7,20	318
DMSO 5%	8,86	1025
DMSO 10%	8,60	1868
DMSO 15%	8,64	2773
DMSO 20%	8,70	3844
Etileno glicol 5%	8,84	1106
Etileno glicol 10%	8,71	2322
Etileno glicol 15%	8,75	2809
Etileno glicol 20%	8,75	3114
Glicerol 5%	8,14	1086
Glicerol 10%	7,74	1831
Glicerol 15%	7,18	2892
Glicerol 20%	6,75	4069

(*) Osmolalidade analisada em Osmômetro de pressão de vapor da marca VAPRO.

Tabela 2 – Avaliações espermáticas por citometria de fluxo: Funcionalidade de Mitocôndria, Integridade de Membrana e DNA e, em tratamentos com diferentes crioprotetores.

Crioprotetor	Concentração (%)	Integridade Membrana (%)	Fragmentação de DNA (%) DFI	Funcionalidade Mitocôndria (%)
Sem Crioprotetor (BTS)	-	4,2±1,4 ^c	3,0±0,5 ^a	12,0±5,0 ^b
DMSO	5	9,0±1,5 ^c	2,5±0,4 ^a	17,1±2,0 ^b
	10	20,0±3,0 ^a	3,0±0,3 ^a	25,0±3,0 ^a
	15	16,0±4,0 ^{ab}	3,0±0,4 ^a	18,0±2,0 ^{ab}
	20	16,0±3,0 ^{ab}	2,0±0,3 ^a	15,0±2,0 ^b
GLI	5	11,0±3,0 ^{bc}	3,0±0,3 ^a	14,0±2,0 ^b
	10	7,2±1,5 ^c	3,0±0,3 ^a	15,0±2,0 ^b
	15	8,0±3,0 ^c	3,0±0,4 ^a	12,0±2,0 ^b
	20	8,0±2,0 ^c	3,0±0,3 ^a	11,0±2,0 ^b
EG	5	8,0±2,0 ^c	3,0±0,5 ^a	19,0±5,5 ^{ab}
	10	6,0±2,0 ^c	3,0±0,3 ^a	12,0±2,0 ^b
	15	6,0±2,0 ^c	2,0±0,3 ^a	13,0±2,0 ^b
	20	5,5±2,0 ^c	2,0±0,4 ^a	13,0±2,0 ^b

*Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

Tabela 3 - Motilidade espermática (taxa e tempo) de sêmen de *G. brasiliensis* e avaliação de EROs por citometria de fluxo.

Crioprotetor	Concentração (%)	Taxa Motilidade (%)	Tempo Motilidade (s)	ERO (MFI = mediana da intensidade de fluorescência)
Sem Crioprotetor		0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^e	15768±15304 ^a
(BTS)				
	5	17,0±3,0 ^b	153,3±23,0 ^a	3623,7±1,0 ^{ab}
DMSO	10	24,0±3,0 ^a	160,5±13,7 ^a	3040,7±2194,4 ^b
	15	11,0±2,0 ^{bc}	101,25±16,89 ^b	2079,5±1516,1 ^b
	20	6,0±1,0 ^{cdef}	71,2±18,3 ^{bc}	1910,7±1435,9 ^b
GLI	5	6,0±2,0 ^{cde}	65,0±22,0 ^{bcd}	1830,3±1214,0 ^b
	10	5,0±2,0 ^{def}	42,2±16,5 ^{cde}	1456,2±864,62 ^b
	15	4,0±2,0 ^{def}	34,0±15,0 ^{cde}	1357,8±816,34 ^b
	20	2,0±1,0 ^{ef}	18,2±12,5 ^{de}	1239,3±76995 ^b
EG	5	8,0±2,0 ^{cd}	75,0±20,0 ^{bc}	8088,5±7143,2 ^{ab}
	10	5,0±2,0 ^{def}	39,0±17,0 ^{cde}	3029,4±2257,4 ^b
	15	5,0±3,0 ^{def}	42,2±18,3 ^{cde}	2467,3±1820,4 ^b
	20	6,0±2,0 ^{cdef}	62,2±19,5 ^{bcd}	1544,5±938,1 ^b

* Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05).