

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu

Diego Martins Pires

Pelotas, 2017

Diego Martins Pires

DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Dr^a. Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P667d Pires, Diego Martins

DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu / Diego Martins Pires ; Antonio Sergio Varela Júnior, orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas, 2017.

44 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Pacu. 2. Açúcares. 3. Citometria de fluxo. 4. Cinética. I. Varela Júnior, Antonio Sergio, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Título.

CDD : 636.0898

Diego Martins Pires

DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Orientador)
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Prof. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Prof. Dr^a. Karina Lemos Goularte
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Prof. Dr. Rodrigo Dessesards Jardim
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida que tenho.

Aos meus pais, Elio (in memoriam) e Cleuza, pelo exemplo de vida e apoio em minhas decisões.

A minha namorada, Vitoria, pelo carinho e ombro amigo e por estar sempre presente me incentivando para que este projeto fosse concluído.

Ao meu orientador, Antonio Sergio, que tenho grande admiração pela sua vasta experiência, a quem devo meu grande desempenho profissional, que sempre me depositou muita confiança e oportunidades de crescimento profissional.

Às colegas Jéssica, Fernanda e Alessandra, as quais me ensinaram muito do que sei, sempre ajudando no que precisava, ao apoio e principalmente pela amizade.

Ao Grupo ReproPel, pelo convívio e por toda a estrutura disponível para a realização deste projeto.

À Piscicultura Panamá pela disponibilidade do espaço, bem como o material de seus peixes, para que este experimento pudesse ser realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, amigos e a todos que me cercam, que de uma forma ou outra, participaram de mais uma etapa de minha vida.

Muito Obrigado!

Resumo

PIRES, Diego Martins. **DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu**. 2017. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A técnica de criopreservação espermática é simples e possibilita a criação de bancos de germoplasma, permitindo a conservação da diversidade genética e reposição de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, durante o processo de criopreservação as células congeladas podem ser danificadas pela toxicidade de crioprotetores, pelos cristais de gelo, resultando em danos ao DNA, mitocôndria, membrana e interferindo na cinética dos espermatozoides. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito da associação de DMSO 10% aos açúcares trealose, rafinose, sacarose e lactose nas concentrações de 50 mM, 100 mM e 150 mM, sobre as células espermáticas de *Piaractus mesopotamicus*. Foi coletado esperma dos animais, através de massagem abdominal, sendo induzidos hormonalmente com extrato de hipófise de carpa 12h antes da extrusão. Em seguida, as amostras coletadas foram diluídas em Beltsville Thawing Solution (BTS), contendo o crioprotetor penetrante dimetilsulfóxido (DSMO) a concentração de 10% (controle) e nos demais tratamentos foram adicionados as diferentes concentrações dos açúcares. Após 60 dias, foram feitas análises de movimentação celular (motilidade total e progressiva, período de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH e BCF) pelo Computer Assisted Semen Analysis (CASA) e análise das estruturas celulares: integridade de DNA, de membrana, funcionalidade mitocondrial, fluidez de membrana e espécies reativas de oxigênio (ROS), através de citometria de fluxo. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro – Wilk, com posterior análise de variância através do teste de Kruskal Wallis, devido os dados não se comportarem de forma paramétrica. As avaliações de motilidade total e período de motilidade se mostraram melhores quando associado 100 mM de rafinose ao DMSO 10% ($P < 0.05$). O deslocamento lateral da cabeça (ALH) obteve bom resultado quando utilizado a associação de DMSO 10% com 100 mM de lactose, 150 mM de sacarose e 150 mM de rafinose, mostrando-se melhor ($P < 0,05$) que o tratamento sem adição de lactose (0 mM). Em conclusão, considerando os parâmetros cinéticos essenciais na criopreservação espermática, os resultados das avaliações de período de motilidade e motilidade total apresentaram suas melhores taxas no tratamento contendo rafinose 100 mM associado ao DMSO 10%.

Palavras-chave: Pacu; açúcares; citometria de fluxo; cinética

Abstract

PIRES, Diego Martins. **Association between DMSO and sugars in the sperm cryopreservation of Pacu** 2017. 44f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The technique of sperm cryopreservation is simple and allows the creation of germplasm banks, allowing the conservation of genetic diversity and replacement of endangered species. However, during the cryopreservation process the frozen cells can be damaged by cryoprotectant toxicity by ice crystals, resulting in damage to DNA, mitochondria, membrane and interfering with sperm kinetics. The objective of this work was to evaluate the effect of the association of 10% DMSO on trehalose, raffinose, sucrose and lactose at 50 mM, 100 mM and 150 mM concentrations on the sperm cells of *Piaractus mesopotamicus*. Sperm were collected from the animals through abdominal massage, being hormonally induced with carp pituitary extract 12h before extrusion. Then the samples were diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) containing the penetrant cryoprotectant dimethylsulfoxide (DSMO) at 10% concentration (control) and in the other treatments were added the different concentrations of sugars. After 60 days, cell movement analysis (total and progressive motility, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH and BCF) were performed by Computer Assisted Semen Analysis (CASA) And analysis of cell structures: DNA integrity, membrane integrity, mitochondrial functionality, membrane fluidity and reactive oxygen species (ROS), through flow cytometry. The Shapiro - Wilk normality test was performed, with subsequent analysis of variance using the Kriskal Wallis test, because the data did not behave in a parametric manner. The evaluations of total motility and motility period were better when associated with 100 mM raffinose at 10% DMSO ($P < 0.05$). The lateral displacement of the head (ALH) obtained a good result when using the association of 10% DMSO with 100 mM lactose, 150 mM sucrose and 150 mM raffinose, showing better ($P < 0.05$) than the treatment without Addition of lactose (0 mM). In conclusion, considering the kinetic parameters essential for sperm cryopreservation, the results of the motility and total motility period evaluations presented their best rates in the treatment containing 100 mM raffinose associated with 10% DMSO.

Keywords: Pacu; Sugars; Flow cytometry; Kinetics

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar lactose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.....	33
Tabela 2	Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar trealose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 Mm. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.....	34
Tabela 3	Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar sacarose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.....	35
Tabela 4	Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar rafinose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.....	36

Lista de Abreviaturas e Siglas

BTS	Beltsville Thawing Solution
CASA	Computer Assisted Semen Analysis
DMSO	Dimetilsulfóxido
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio

Sumário

1 Introdução.....	09
2 Artigo.....	13
3 Considerações Finais.....	37
Referências.....	38

1 Introdução

A criopreservação de espermatozoides é uma técnica simples, porém importante para a conservação das espécies, como forma de preservação da biodiversidade (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al, 2009). Sendo utilizada para proteção das linhagens e como uma ferramenta útil para facilitar a reprodução animal. Estudos dessas técnicas tem sido amplamente desenvolvidos e aplicados aos peixes nos últimos anos, devido ao grande investimento em reprodução por parte da piscicultura, proporcionando benefícios como contínuo fornecimento de sêmen de boa qualidade para fertilização artificial (VARELA et al. 2012), sendo cruciais para a conservação de recursos aplicados a aquicultura. Além disso, a técnica possibilita a criação de bancos de germoplasma, pois permite a conservação da diversidade genética e reposição de espécies ameaçadas de extinção (VIVEIROS et al. 2009, MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2009).

No entanto, estas células congeladas podem ser danificadas pela toxicidade de crioprotetores, resultando em danos ao DNA, mitocôndria, bem como outras lesões (OGIER DE BAULNY et al, 1997; CABRITA et al, 1998; BABIAK et al, 2001; LAHNSTEINER et al, 1995; CABRITA et al, 2005). Estes danos nem sempre são ultra-estruturais, podendo ser expressos em várias fases, tais como a motilidade do esperma, fertilização ou capacidade de desenvolvimento. Isto acontece no processo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides, onde pode ser gerados efeitos nas células espermáticas como, por exemplo, a formação do cristal de gelo, onde, devido ao choque térmico causado pelo rápido reestabelecimento do metabolismo celular após o descongelamento, são evidenciados danos funcionais bioquímicos, redução de motilidade, viabilidade e dificulta a fertilização. (LEBOEUF et al, 2000).

O stress oxidativo, por sua vez, tem sido destacado nos últimos anos no que se refere a tais danos (THUWANUT et al, 2008). Desta forma, alguns estudos demonstraram que a técnica de criopreservação induz o aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio - ROS (CHATTERJEE & GAGNON, 2001; TSELKAS et al, 2000) e diminuiu a taxa de antioxidantes (BILODEAU et al, 2000; MARTI et al,

2008). Sabe-se que elevados níveis de ROS podem danificar lipídios, proteínas e DNA, e, assim, poderia ser responsável pela redução da viabilidade de espermatozoides criopreservados. Por esta razão, os crioprotetores têm sido amplamente utilizados nos protocolos de congelamento de sêmen, pois reduz a temperatura de congelamento da célula, impedindo a formação de cristais de gelo intra e extracelular (CARNEIRO 2007). Assim, partir da técnica de criopreservação é possível destacar a importância dos crioprotetores penetrantes e não penetrantes, que podem oferecer efeitos nos celulares espermáticos, causando redução de danos induzidos no pré e pós congelamento (CORCUERA et al, 2007). No entanto, durante a criopreservação, alguns fatores podem alterar o estado fisiológico dos espermatozoides, tais como a composição do diluente, as taxas de congelamento e descongelamento, além do próprio crioprotetor utilizado, tendo em vista sua concentração (LAHNSTEINER et al, 1995; CHAO & LIAO, 2001).

Os crioprotetores penetrantes, tais como Dimetil Sulfóxido (DMSO) e Metanol (MeOH), tem sido comumente usado na criopreservação de sêmen de peixes, trazendo bons resultados em seus experimentos. Entretanto, tais estudos confirmar que um crioprotetor penetrante pode melhorar motilidade do esperma e por sua vez a fertilização, quando associado a crioprotetores não penetrantes, por exemplo, açúcar ou proteína.

Alguns autores afirmam que os crioprotetores não penetrantes, como os açúcares (dissacarídeos), protegerem a membrana celular a partir do volume celular no congelamento e descongelamento (SILVA et al, 2015), sendo benéfico em muitas espécies, como os ovinos (AISEN et al 1995; SÁNCHEZ-PARTIDA et al 1992; JAFAROGHLI et al, 2011), caprinos (ABOAGLA & TERADA, 2003; bovinos (FOOTE et al, 1993), e roedores (STOREY et al, 1998). Entre os dissacarídeos utilizados como não penetrante, destaca-se a utilização de sacarose como um crioprotetor mais efetivo (MOCE e VICENTE, 2009). Esses dissacarídeos, tais como trealose e sacarose promovem a desidratação celular e influenciam a cristalização padrão de água (NICOLAJSEN & HVIDT, 1994), o que contribui para a redução da formação de cristais de gelo na célula (AISEN et al, 2002; CROWE et al, 1998).

Conforme Malo et al (2010), a adição de açúcares como extensor de congelamento, devido a pressão osmótica, os sacarídeos contribuem para a desidratação celular, agindo de fato como crioprotetor, e após descongelamento com atuação sobre a integridade da membrana espermática, onde as moléculas são

capazes de fornecer energia suficiente para os espermatozoides para que ocorra fertilização. Os efeitos destes crioprotetores também são evidenciados, por exemplo, a partir da restauração da pressão osmótica com base na diluição durante descongelamento, onde esta pressão é restaurada aos valores normais. Aisen et al (2000) afirma que a trealose é capaz de preservar a viabilidade e a integridade da membrana, podendo preservar áreas específicas da membrana do espermatozoide durante o congelamento e descongelamento e, por sua vez, manter a viabilidade do espermatozoide durante o teste de tolerância térmica. Além disso, Piassi et al (2009), destaca Lactose e Sacarose como crioprotetor eficaz ao espermatozoide, evidenciando a viabilidade espermática pós congelamento. A sacarose é capaz de proporcionar maior atividade enzimática ao espermatozoide e conseqüentemente, uma maior capacidade de fertilização (Babiak et al, 2001). Atualmente existem estudos que objetivam desenvolver protocolos para congelamento de sêmen de coelho, utilizando DMSO em combinação com sacarose como crioprotetor não permeável, (IAFFALDANO et al, 2012; ROSATO & IAFFALDANO, 2013).

Devido as características do sêmen, tais como morfologia e fisiologia, variar entre as espécies, o desenvolvimento desses protocolos torna-se muito mais exigido para a criopreservação de sêmen de espécies específicas. Tais protocolos dependem da padronização através da determinação de diluentes e crioprotetores mais eficazes para a espécie em questão, mantendo a alta qualidade espermática mais próxima possível quando fresco (LAHNSTEINER et al, 1995; GLOGOWSKI et al, 1999). Mais de 17 espécies de peixes já têm seu protocolo de criopreservação de sêmen determinado, por exemplo, pertencentes às famílias Characidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Pimelodidae (CAROSFELD et al, 2003; VIVEIROS & GODINHO, 2009).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), por sua vez, mostra grande aceitação na piscicultura brasileira (CASTAGNOLLI & ZUIM, 1985), sendo um grande peixe tropical characiforme, classificado como herbívoro / frugívoro. A espécie é intensivamente cultivada em diferentes regiões da América do Sul (Abimorad et al., 2008, Jomori et al., 2008). O pacu é caracterizado como uma espécie migratória e tem um ciclo reprodutivo sazonal (Zaniboni-Filho & Weingart, 2007), onde sua reprodução ocorre entre os meses de novembro e janeiro. O *P. mesopotamicus*, por sua vez, mostra grande aceitação na piscicultura brasileira (CASTAGNOLLI & ZUIM,

1985), no entanto, não há registro de um protocolo de utilização da técnica de criopreservação para esta espécie.

Desta forma, o objetivo do trabalho é avaliar o efeito da associação de DMSO 10% aos açúcares lactose, trealose, sacarose e rafinose nas concentrações de 0 mM, 50 mM, 100 mM, e 150 mM sobre as células espermáticas de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2 Artigo

DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu

Diego Martins Pires, Carine Dahl Corcini, Alessandra Cardoso da Silva, Stela Mari Menegello Gheller, Fernanda Alves Pereira, Jéssica Ribeiro Pereira, Juan Ramon Esquivel Muelbert, Rodrigo Dessesards Jardim, Juan Ramon Esquivel Garcia, Antonio Sergio Varela Junior

Submetido à revista Animal Reproduction Science

DMSO associado com açúcares na criopreservação espermática de Pacu**Association between DMSO and sugars in the sperm cryopreservation of Pacu**

Diego Martins Pires¹ Carine Dahl Corcini¹ Alessandra Cardoso da Silva¹ Stela Mari Menegello Gheller¹ Fernanda Alves Pereira² Jéssica Ribeiro Pereira² Juan Ramon Esquivel Muelbert³ Rodrigo Dessesards Jardim², Juan Ramon Esquivel Garcia⁴ Antonio Sergio Varela Junior^{2*}

Resumo

A técnica de criopreservação espermática é simples e possibilita a criação de bancos de germoplasma, permitindo a conservação da diversidade genética e reposição de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, durante o processo de criopreservação as células congeladas podem ser danificadas pela toxicidade de crioprotetores, pelos cristais de gelo, resultando em danos ao DNA, mitocôndria, membrana e interferindo na cinética dos espermatozoides. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito da associação de DMSO 10% aos açúcares trealose, rafinose, sacarose e lactose nas concentrações de 50 mM, 100 mM e 150 mM, sobre as células espermáticas de *Piaractus mesopotamicus*. Foi coletado esperma dos animais, através de massagem abdominal, sendo induzidos hormonalmente com extrato de hipófise de carpa 12h antes à extrusão. Em seguida, as amostras coletadas foram diluídas em Beltsville Thawing Solution (BTS), contendo o crioprotetor penetrante dimetilsulfóxido (DSMO) a concentração de 10% (controle) e nos demais tratamentos foram adicionados as diferentes concentrações dos açúcares. Após 60 dias, foram feitas análises de movimentação celular (motilidade total e progressiva, período de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH e BCF) pelo Computer Assisted Semen Analysis (CASA) e análise das estruturas celulares: integridade de DNA, de membrana, funcionalidade mitocondrial, fluidez de membrana e espécies reativas de oxigênio (ROS), através de citometria de fluxo. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro – Wilk, com posterior análise de variância através do teste de Kruskal Wallis, devido os dados não se comportarem de forma paramétrica. As avaliações de motilidade total e período de motilidade se mostraram

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

³Piscicultura Panamá, Paulo Lopes, SC, Brasil. ^{IV}Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul), Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Faculdade de Veterinária, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Tubarão, SC, Brasil

*Autor para correspondência E-mail: antoniovarela@furg.br

melhores quando associado 100 mM de rafinose ao DMSO 10% ($P < 0.05$). O deslocamento lateral da cabeça (ALH) obteve bom resultado quando utilizado a associação de DMSO 10% com 100 mM de lactose, 150 mM de sacarose e 150 mM de rafinose, mostrando-se melhor ($P < 0,05$) que o tratamento sem adição de lactose (0 mM). Em conclusão, considerando os parâmetros cinéticos essenciais na criopreservação espermática, os resultados das avaliações de período de motilidade e motilidade total apresentaram suas melhores taxas no tratamento contendo rafinose 100 mM associado ao DMSO 10%.

Palavras-chave: Pacu; açúcares; citometria de fluxo; cinética

1. Introdução

A criopreservação de espermatozoides é uma técnica simples, porém importante para a conservação das espécies, além de manter a variabilidade da biodiversidade (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al, 2009), sendo utilizada para proteção das linhagens e da reprodução animal. Estudos dessas técnicas tem sido amplamente desenvolvido e aplicadas aos peixes nos últimos anos, devido ao grande investimento em reprodução por parte da piscicultura, facilitando o contínuo fornecimento de esperma de boa qualidade para fertilização artificial (VARELA et al. 2012). Além disso, a técnica possibilita a criação de bancos de germoplasma, pois permite a conservação da diversidade genética e reposição de espécies ameaçadas de extinção (VIVEIROS et al. 2009, MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2009).

Os crioprotetores têm sido amplamente utilizados nos protocolos de congelamento espermático, pois reduzem a temperatura de congelamento da célula, impedindo a formação de cristais de gelo intra e extracelular (CARNEIRO, 2007). Assim, partir da técnica de criopreservação é possível destacar a importância dos crioprotetores penetrantes e não penetrantes, que podem oferecer efeitos nas celulares espermáticas, causando redução de danos induzidos no pré e pós congelamento (CORCUERA et al, 2007). Os crioprotetores penetrantes, tais como Dimetil Sulfoxido (DMSO) e Metanol (MeOH), tem sido comumente usados na criopreservação espermática de peixes, trazendo bons resultados em seus experimentos (CAROSFELD et al., 2003). Entretanto, tais estudos confirmam que um crioprotetor penetrante pode melhorar motilidade do esperma e por sua vez a fertilização, quando associado a crioprotetores não penetrantes, por exemplo, açúcar ou proteína. A utilização de açúcares como a rafinose tem sido também utilizado na criopreservação de oócitos de mamíferos, onde sua adição intra e extracelular associados a pequenas quantidades

de dimetilsulfóxido traz em boas taxas de fertilização e desenvolvimento (EROGLU, 2010). Alguns autores afirmam que crioprotetores como os açúcares, protegerem a membrana celular a partir do volume celular no congelamento e descongelamento (SILVA et al, 2015), sendo benéfico em muitas espécies, como em ovinos (AISEN et al 2005; SÁNCHEZ-PARTIDA et al 1992; JAFAROGHLI et al, 2011), caprinos (ABOAGLA & TERADA, 2003), bovinos (FOOTE et al, 1993), e roedores (STOREY et al, 1998). Os efeitos destes crioprotetores também são evidenciados, por exemplo, a partir da restauração da pressão osmótica com base na diluição durante descongelamento, onde esta pressão é restaurada aos valores normais. Felizardo et al (2010) sugere que a utilização de combinações entre crioprotetores pode trazer melhor eficácia crioprotetora, confirmada através da avaliação de motilidade espermática.

Atualmente existem estudos que objetivam desenvolver protocolos para congelamento espermático, utilizando DMSO em combinação de açúcares como a sacarose, crioprotetor não penetrante, por exemplo, em coelhos (IAFFALDANOET al, 2012;. ROSATO & IAFFALDANO, 2013). Desta forma, devido características do sêmen, tais como morfologia e fisiologia, variar entre as espécies, o desenvolvimento desses protocolos torna-se muito mais exigido para a criopreservação de sêmen de espécies específicas. Tais protocolos dependem da padronização através da determinação de diluentes e crioprotetores mais eficazes para a espécie em questão mantendo a alta qualidade do descongelado assim como é quando fresco (LAHNSTEINER et al, 1995; GLOGOWSKI et al, 1999). Mais de 17 espécies de peixes já têm seu protocolo de criopreservação espermática determinado, por exemplo, pertencentes às famílias Characidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Pimelodidae (CAROSFELD et al, 2003; VIVEIROS & GODINHO, 2009).

O *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) é um grande peixe tropical characiforme, classificado como herbívoro / frugívoro. A espécie é intensivamente cultivada em diferentes regiões da América do Sul (ABIMORAD et al., 2008, JOMORI et al., 2008). O pacu é caracterizado como uma espécie migratória e tem um ciclo reprodutivo sazonal (ZANIBONI-FILHO & WEINGART, 2007), onde sua reprodução ocorre entre os meses de novembro e janeiro. O *P. mesopotamicus*, por sua vez, mostra grande aceitação na piscicultura brasileira (CASTAGNOLLI & ZUIM, 1985), no entanto, não há registro de um protocolo de utilização da técnica de criopreservação para esta espécie.

O objetivo do trabalho é avaliar o efeito da associação de DMSO 10% aos açúcares lactose, trealose, sacarose e rafinose nas concentrações de 0 mM, 50 mM, 100 mM, e 150 mM sobre as células espermáticas de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2. Material e Métodos

Os espermatozoides dos peixes foram coletados, na propriedade de piscicultura Panamá localizada no município de Paulo Lopes – SC. Os animais foram induzidos hormonalmente com extrato de hipófise de carpa e após 12h, receberam massagem abdominal para extrusão do espermatozoide. O conteúdo coletado foi armazenado em tubos falcon e mantidos em isopor com temperatura de 8°C, onde posteriormente foi avaliado em microscópio de contraste de fases, em lâmina sob lâmina. Foram congeladas apenas as amostras que obtiveram 80% ou mais de motilidade (subjetiva) após 10 segundos de ativação e que não foram contaminadas com fezes, urina ou ativação com água. Em seguida, foi adicionado ao espermatozoide coletado Beltsville Thawing Solution (BTS), segundo protocolo de Pursel & Johnson (1975), com pH 7,2 e osmolaridade 330 mOsm/Kg, na proporção 1:9 (v/v). As amostras foram divididas em 4 partes, para a realização dos seguintes experimentos:

Para realização dos experimentos, foram adicionados os açúcares Lactose (experimento 1), Trealose (experimento 2), Sacarose (experimento 3) e Rafinose (experimento 4), nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM, ambos associados ao crioprotetor penetrante Dimetilsulfóxido (DSMO) a 10%.

Após, envasadas em palhetas de 0,25µl, devidamente identificadas, vedadas com álcool polivinílico e armazenadas em raques de metal, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 20 minutos, para maior contato entre o espermatozoide e os tratamentos. Em seguida as raques foram colocadas em botijão Dryshipper com vapor de nitrogênio a -70°C por 12 horas, e transferidas para botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

Após 60 dias, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 45°C por 8 segundos, o conteúdo das mesmas foram colocados em tubo cônico de 1,5 mL e armazenados resfriados a 4°C. Foram realizadas as análises de cinética espermática e funcionalidade celular.

2.1. Cinética Espermática

A análise de cinética espermática foi realizada através do equipamento Computer Assisted Semen Analysis (CASA), usando o software Sperm Vision® (Minitube). Para obtenção dos dados, foram capturados 10 campos tendo ao final no mínimo 500 células. Os parâmetros para avaliação cinética, foram motilidade total (%), motilidade progressiva (%), distância média percorrida DAP (µm), distância curvilínea DCL (µm), distância retilínea DSL (µm), velocidade média do percurso VAP (µm/s), velocidade curvilínea VCL(µm/s),

velocidade retilínea VSL ($\mu\text{m/s}$), retilinearidade STR (VSL/VAP, %), linearidade LIN (VSL/VCL, %), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça ALH (μm), frequência de batimento cruzado BCF(Hz). O período de motilidade, foi avaliado pela interrupção total da circulação progressiva de espermatozoides, após ativação com água Milli-Q, seguindo o método descrito por Sorensen Júnior (1979).

2.2. Funcionalidade Celular

A análise das estruturas celulares (integridade de DNA, membrana, mitocôndria, fluidez de membrana e espécies reativas de oxigênio) foi realizada através da citometria de fluxo Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies) composto por dois lasers, sendo um azul (Argônio 488 nm) e outro violeta (UV 405 nm). Para a detecção da população de espermatozoides, eventos não-espermatozoides foram removidos pela dispersão de FSC x SSC (Petrunkina et al, 2005; Piehler et al, 2006) e para a eliminação de detritos foi utilizada a coloração das células pelo Hoechst 33342 numa concentração de 16,2 mM (Sigma - AldrichCo. - St. Louis , MO , EUA), exceto para o taxa de fragmentação do DNA. Para a leitura dos parâmetros, todas as células foram coradas com fluoróforos e após 10 min, adicionado PBS livre de cálcio (80g de NaCl, 11,5gde KCl, 24g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄ em 1L água deionizada). Sendo feita a leitura de 20.000 espermatozoides por amostra, com um fluxo de 200 células/s.

2.2.1. Integridade de membrana

Para avaliação da integridade de membrana, foram utilizados fluoróforos, sendo eles, Sybr14 e iodeto de propídio (IP) (Minitübe, Tiefenbach, Germany). Assim, através das amostras de sêmen descongelado, foram confeccionadas alíquotas misturadas com as devidas sondas fluorescentes (0,25 μM de Sybr14 e 7,5 μM IP conforme instruções do fabricante – Minitübe) e incubadas por 5 minutos. Para a classificação, foram considerados espermatozoides não lesados, aqueles com membrana funcional (Sybr + / IP-) e lesados aqueles espermatozoides com membrana não funcional (Sybr + / IP +; Sybr- / IP +; Sybr- / IP-) (Figuroa et al 2015).

2.2.2. Fluidez de Membrana

Para análise de fluidez de membrana foram utilizados 2,7 μM de merocianina hidrofóbica 540 (M540) e 0,1 μM de YO PRO-1 (Invitrogen - Eugene, OR, EUA), adicionado a 10 μL de amostra descongelada incubados por 5 min. Para avaliação, foram classificadas células espermáticas integras com fluidez alta (alta concentração de M540) e células espermáticas com fluidez baixa (baixa concentração de M540). Para calcular a taxa de fluidez de membrana foi utilizado número de espermatozoides com baixa fluidez, dividindo pelo número de espermatozoides com baixa fluidez, somados aos espermatozoides com alta fluidez *100. Para esta avaliação, são considerados apenas espermatozoides íntegros, ou seja, aqueles negativos no fluoróforo YO-PRO, (Fernández-Gago et al 2013).

2.2.3. Funcionalidade Mitocondrial

Para avaliação da funcionalidade mitocondrial, foi utilizada uma sonda específica contendo 3,1 μM de Rhodamina 123 (fluorescência verde) e 7,5 μM de IP em 10 μL de amostra descongelada por 5 min. A classificação funcional das células se dá em alta e baixa funcionalidade, ou seja, alta fluorescência pela acumulação de Rhodamina e baixa fluorescência pela acumulação de Rhodamina. Desta forma, apenas espermatozoides íntegros (IP negativo) são avaliados (Liu et al 2015). Através do cálculo (número de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial/ número de espermatozoides alto potencial de membrana mitocondrial + espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial *100), é obtida a taxa de funcionalidade de mitocôndria.

2.2.4. Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A concentração de ROS, foi realizada através de 1.0 μM do fluoróforo 2'7' diclorofluoresceíniadiacetato (H2DCFDA) (emite fluorescência verde quando oxidado) e 7.5 μM de IP. Foi utilizada a intensidade mediana de fluorescência verde apenas para espermatozoides íntegros (IP-) (Domínguez-Rebolledo et al. 2011).

2.2.5. Integridade de DNA

A integridade de DNA foi avaliada pelo ensaio da estrutura de cromatina (SCSA). Assim, 10 μL das células espermáticas descongeladas são demarcadas com 5 μL de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10 μL de Triton 1X (Triton X-100, 1%) (v /

v) com intervalos de 30 segundos, para verificação desse parâmetro. Logo após, é adicionado e incubado por 30 segundos, o corante acrimine orange, não ultrapassando o período de 2 minutos para fazer a leitura. Já a classificação espermática se dá através de integridade e fragmentação (Jenkinset al 2015), sendo DNA integro (verde) e DNA fragmentado (laranja/vermelho). Para obtenção da taxa desta avaliação, se é calculado através do número de espermatozoides com DNA fragmentado/número de espermatozoides DNA integro + espermatozoides com DNA fragmentado *100.

2.3. Estatística

Neste trabalho, os dados descritivos (média e erro padrão da média) foram gerados para cada uma das variáveis dependentes, sendo eles: integridade da membrana plasmática, índice de fragmentação do DNA e da fluidez da membrana plasmática, motilidade total de esperma, funcionalidade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio (ROS), motilidade total e progressiva do esperma, e seu período de motilidade. Para todas estas variáveis dependentes foi realizada a análise de normalidade pelo teste de Shapiro - Wilk. Depois foi realizado teste de Kruskal Wallis devido os dados se comportarem de forma não paramétricos. Foi utilizado o software Statistix® 2009.

3. Resultados

No experimento 1 (Tabela 1), avaliações deslocamento lateral da cabeça (ALH) obteve bom resultado quando utilizado a associação de 100 mM de lactose com o DMSO 10%, mostrando-se melhor ($P < 0,05$) que o tratamento sem adição de lactose (0 mM). O tratamento de 100 mM de Lactose com DMSO 10 %, também apresentou melhor resultado ($P < 0,05$) com relação a avaliação de integridade de mitocôndria. Não houve diferença de resultados ($P > 0,05$) entre a adição ou não de lactose à solução diluidora nas avaliações de motilidade total e progressiva, período de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, integridade e fluidez de membrana, ROS e integridade de DNA, no presente experimento.

A trealose associada a 10% de DMSO não incrementou a preservação das células espermáticas, pois as avaliações de motilidade total e progressiva, cinética espermática (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH E BCF), integridade de membrana, integridade mitocondrial, fluidez de membrana, espécies reativas de oxigênio e integridade de DNA, nos tratamentos com adição deste açúcar, não diferiram ($P > 0,05$) do tratamento

controle (0 mM de trealose) no experimento 2. A adição de Trealose 50 mM no diluente com DMSO aumentou ($P < 0,05$) o período de motilidade, quando comparado ao controle (Tabela 2).

No terceiro experimento (Tabela 3), não houve diferença ($P > 0.05$) nas avaliações de motilidade total e progressiva, período de motilidade, cinética espermática (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH E BCF), integridade de membrana, fluidez de membrana, ROS e integridade de DNA entre os tratamentos. No entanto, em comparação com o tratamento sem adição de açúcar (0 mM), o parâmetro ALH (deslocamento lateral da cabeça), apresentou melhor resultado ($P < 0.05$) no tratamento contendo DMSO 10% associado a sacarose na concentração de 150 mM. Os tratamentos contendo sacarose (50, 100 e 150 mM), mostraram-se benéficos em comparação ao tratamento controle (0 mM) na avaliação de integridade de mitocôndria ($P < 0.05$).

Por fim, no experimento de número 4 (Tabela 4), podemos ver que as avaliações de motilidade total e período de motilidade se mostraram melhores quando associado 100 mM de rafinose ao DMSO 10% ($P < 0.05$). O parâmetro ALH (deslocamento lateral da cabeça), apresentou melhor resultado ($P < 0.05$) no tratamento contendo DMSO 10% associado a 150 mM de rafinose. Com relação aos parâmetros de cinética espermática (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB e BCF) e de citometria (integridade de membrana, fluidez de membrana, integridade de DNA e ROS) não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos com ou sem associação da sacarose ao DMSO 10% no presente experimento.

4. Discussão

Este é o primeiro estudo que avalia a utilização de açúcares na criopreservação espermática de *Piaractus mesopotamicus*, e devido aos resultados encontrados foi possível estabelecer quais açúcares tem maior eficiência crioprotetora para a célula espermática da espécie. A rafinose é um sacarídeo não permeável que tem sido avaliado mais frequentemente protocolos de criopreservação de espermatozoides de mamíferos, como por exemplo, roedores. Yokoyama et al. (1990) foram os primeiros a ter sucesso com a utilização deste açúcar na criopreservação espermática em ratos. Segundo Tuncer et. al. (2010), a rafinose desempenha um papel crioprotetor na motilidade do espermatozoide mamífero, e na proteção contra anormalidade do acrossoma e danos ao DNA.

A associação das concentrações dos açúcares aqui testados ao DMSO 10% apresentaram uma correlação negativa e significativa com os parâmetros de cinética, de modo

que quanto mais concentrado foi o meio em que o espermatozoide se encontrava, menor foi sua cinética. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos no parâmetro ALH (deslocamento lateral da cabeça) em todos experimentos deste trabalho, o aumento da viscosidade do açúcar promoveu queda na velocidade e distância percorrida pelo espermatozoide.

Com relação as associações de açúcares ao DMSO 10%, as concentrações testadas neste estudo mostraram diferença significativa na motilidade, podendo ser observado maior motilidade (37,3%) pós-descongelamento nos espermatozoides criopreservados com associação de 100 mM de rafinose (Experimento 4). Isto indica grande importância crioprotetora deste sacarídeo, uma vez que estudos anteriores mostram que os efeitos de DMSO associados com crioprotetores não penetrantes, podem ser benéficos em termos de taxa de motilidade dos espermatozoides de peixes, tais como *B. insignis* (Viveiros et al., 2011), *B. Orbignyanus* (Maria et al., 2006a, b), *Colossoma macropomum* (Carneiro et al., 2012), *P. mesopotamicus* (Orfão et al., 2011), *P. brachypomus* (Nascimento et al. 2010) e *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009).

Segundo Billard & Cosson (1992) em termos de cinética espermática, para espécies de água doce com fertilização externa a duração da motilidade varia entre 30 e 60 segundos. Dessa forma, os melhores períodos de motilidade neste estudo, foram os tratamentos associação de DMSO 10% a 50 e 100 mM de rafinose, com período de 52,4 segundos ambos tratamentos. Com base nesses achados, podemos concluir que os períodos de motilidade dos experimentos realizados neste trabalho corroboram com estudos de criopreservação espermática já realizados em peixes.

A funcionalidade mitocondrial espermática tem alta correlação com a motilidade devido a utilização de sacarídeos pela mitocôndria durante produção de ATP (NAJAFI et al, 2013). Neste estudo os açúcares sacarose (50, 100 e 150 mM) e lactose (100 mM), associados ao DMSO 10%, apresentaram melhor resultado na avaliação de integridade mitocondrial de espermatozoides de Pacu, chegando a obter 82,8% na concentração de 50 mM de Sacarose. Farshad e Akhondzadeh (2008) sugeriram que a associação de sacarose na criopreservação de semen de cabra melhorou a congelabilidade das amostras

Aboagla & Terada (2003) levantaram a hipótese de que a trealose e a sacarose penetram na membrana plasmática dos espermatozoides e formam ligações de hidrogênio com os grupos de cabeça fosfolipídios. Assim, eles também criam uma Pressão, induzindo desidratação celular, aumento da fluidez e menor incidência de formação de gelo intracelular (Molinia et al., 1994a, Aisen et al., 2002). No entanto, este trabalho não corroborou, uma vez

que não houve diferença significativa entre a avaliação de fluidez de membrana e as concentrações dos açúcares testados. Embora não seja conhecido o mecanismo exato pelo qual os açúcares trealose e sacarose penetrem e preservem a membrana do espermatozoide durante o congelamento, existe a hipótese que esses açúcares provavelmente impeçam a alteração deletéria de fosfolípidios na membrana neste processo (Aboagla e Terada, 2003).

Com relação ao DNA, Loi et al. (2008), sugerem que as moléculas de trealose não só interagem com esta organela, mas também formam um grande número de ligações de hidrogênio entre si, formando um meio vítreo e viscoso, reduzindo assim as flutuações estruturais do DNA e prevenindo sua desnaturação. Deste modo, a concentração à qual a trealose exerce proteção é dependente de espécies, tipo de célula, estado celular e o método de preservação (Mittal & Devireddy, 2008). No presente trabalho, os melhores resultados de integridade de DNA, foram encontrados na associação de DMSO 10% com trealose, especificamente na concentração de 150 mM, chegando a 97,4% de integridade. Badr et al. (2010), indicaram que a adição de Trealose (100 mM) ao diluente de congelamento, ótima para criopreservação, levando à redução de estresse oxidativo e melhoria da viabilidade e desenvolvimento embrionário in vitro de espermatozoide de búfalo. Em contrapartida, Kozdrovski (2009) descreve que mais de uma concentração (0, 50 e 100 mM) de trealose em congelamento de espermatozoide de coelho são benéficas para motilidade total e progressiva, porém quanto mais alta concentração dos açúcares, melhores eram as taxas de integridade de DNA. No presente trabalho, os melhores resultados de integridade de DNA, foram encontrados na associação de DMSO 10% com trealose, especificamente na concentração de 150 mM, chegando a 97,4% de integridade, corroborando com estudos que utilizam tal avaliação em criopreservação seminal.

5. Conclusão

Os parâmetros cinéticos período de motilidade e motilidade total apresentaram suas melhores taxas no tratamento contendo rafinose 100 mM associado ao DMSO 10% no descongelamento espermático de Pacú, *Piaractus mesopotamicus*.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil) pelas bolsas de pós-graduação atribuída a J. R. Pereira, F. A. Pereira, D. M. Pires; bolsas de pesquisadores de A. S. Varela Junior (307195/2015-7) e C. D.

Corcini (306356/2014-7). Agradecemos a Piscicultura Panamá (Paulo Lopes, SC, Brasil) e ao grupo Reprodução Animal Comparada (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil) pela assistência durante esse trabalho.

6. Referências

ABIMORAD, E.G.; SQUASSONI, G.H.; CARNEIRO, D.J. Apparent digestibility of protein and amino acid in some selected feed ingredients for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquacult. Nutr.* v.14, p.374–380. 2008. Disponível em <http://www.bioreprod.org/content/69/4/1245.full.pdf+html> doi: 10.1095/bioreprod.103.017889.

ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1245-50, 2003. Disponível em <http://www.bioreprod.org/content/69/4/1245.full.pdf+html> doi: 10.1095/bioreprod.103.017889.

AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v.50, p.239-249, 2005. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224005000301> doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.02.002.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, v.57, p.1801-1808, 2002. Disponível em <http://www.publish.csiro.au/paper/AN13431.htm> doi: 10.1071/AN13431.

AISEN, E.; ÁLVAREZ, H.; VENTURINO, A.; LARREGUY, D. Efecto comparativo de los diluyes conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación de

semen ovino. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal*, V.10, p.233-31, 1995. Disponível em <http://www.publish.csiro.au/paper/AN13431.htm> doi: 10.1071/AN13431.

BADR, M.R.; MARY, G.A.; HASSAN, M.H. Effect of trehalose on Cryopreservation, Oxidative Stress and DNA Integrity of Buffalo Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.1, p.50-57, 2010.

BILLARD R.; COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.*, v.31, p.261:122, 1992. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jez.1402610203/abstract> doi: 10.1002/jez.1402610203.

CARNEIRO, P.C.F.; AZAVEDO, H.C.; SANTOS, P.J; MARIA, A.N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryo Letters*, v.33(5), p.385-393, 2012. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2012/00000033/00000005/art00006>

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31(3), p.361-366, 2007.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v.63, p.472-89, 2003. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x/abstract> doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu *Colossoma mitrei* (BERG, 1895). *Boletim Técnico do CEPTA*, p.26, 1985.

CORCUERA, B.; MARIGORTA, P.; SAGÜÉS, A.; SAIZ-CIDONCHA, F.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology*

v.67, p.1150-7, 2007. Disponível em
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X07000143> doi:
10.1016/j.theriogenology.2007.01.002.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.393-403, 2011. Disponível em:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2010.01677.x/abstract> doi:
10.1111/j.1439-0531.2010.01677.x.

EL-BADR, M.R.; MARY, G.; ABD, E.M.; HASSAN, M.H. Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. *J Reprod. Infertil.* v.1, p.50–7. 2010. Disponível em: [http://www.j-evs.com/article/S0737-0806\(16\)30077-6/abstract](http://www.j-evs.com/article/S0737-0806(16)30077-6/abstract) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.020>.

EROGLU, A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. *Cryobiology*, v.60, p.S54–S59, 2010. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891843/> doi:
10.1016/j.cryobiol.2009.07.001

FARSHAD, A. & AKHONDZADEH, S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* v.21, p.1721-1727, 2008. Disponível em:
<http://ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2008.80159> doi: 10.5713/ajas.2008.80159.

FELIZARDO, V.O; MELLO, R.A; MURGAS, L.D.S; ANDRADE, E.S; DRUMOND, M.M; ROSA, P.V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction*, v.122, p.259–263, 2010.

Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-4320\(10\)00404-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-4320(10)00404-5) doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.020.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. *Theriogenology*, v.80, p.400–410, 2013. Disponível em: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(13\)00185-4/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(13)00185-4/abstract) doi:10.1016/j.theriogenology.2013.05.003.

FIGUEROA, E.; MERINO, O.; RISOPATRÓN, J.; ISACHENKO, V.; SÁNCHEZ, R.; EFFER, B.; ISACHENKO, E.; FARIAS, J.G.; VALDEBENITO, I. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, v.83(2), p.238–245, 2015. Disponível em: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(14\)00505-6/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(14)00505-6/abstract) doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.015.

GLOGOWSKI, J.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. *North American Journal of Aquaculture*, v. 61, p.258-262, 1999. Disponível em: <https://kb.osu.edu/dspace/handle/1811/37298> doi: 1811/37298.

IAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; PINA ROSATO, M. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: dimethyl acetamide versus dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, v.78, p.1381-1389, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898020> doi:10.1016 / j.theriogenology.2012.06.009.

JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M.J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, v.96, p.58-63, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448810003111> doi: 10.1016 / j.smallrumres.2010.11.010

JENKINS, J.A.; DRAUGELIS-DALE, R.O.; PINKNEY, A.E.; IWANOWICZ, L.R.; BLAZER, V.S. Flow cytometric method for measuring chromatin fragmentation in fixed sperm from yellow perch (*Perca flavescens*). *Theriogenology*, v.83, p.920–931, 2015. Disponível em: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(14\)00646-3/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(14)00646-3/abstract) doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.028

JOMORI, R.K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Stable carbon (d13C) and nitrogen (d15N) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquac. Res.* v.39, p.370–381. 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2007.01760.x/abstract;jsessionid=04EFF3208B75DCCBB836E98790326B60.f02t04> doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01760.x.

KOZDROWSKI R. The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* v.116, p.326–34, 2009. Disponível em: [http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(09\)00038-4/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(09)00038-4/abstract) doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.02.012.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta* f. *fario* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp. *Aquaculture Research*, v.26, p.801-7, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924822> doi: 10.1016/S0378-4320(00)00156-1.

LIU, Q.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, X.; XU, S.; MA, D.; XIAO, Z.; XIAO, Y.; LI, J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol Biochem*, v.41, p.413–422, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-014-9993-9> doi: 10.1007/s10695-014-9993-9.

LOI, P.; MATSUKAWA, K.; PTAK, G.; CLINTON, M.; FULKA JR, J. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS One*, v.3, p.2978, 2008. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002978> doi: 10.1371/journal.pone.0002978.

MARIA, A.N.; VIVEIROS A.T.M.; FREITAS, R.T.F.; OLIVEIRA, A.V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v.260, p.298–306, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848606004558> doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.011.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GÓMEZ-ROMANO, F.; BLANCO, G.; SÁNCHEZ, J.A.; HERRÁEZ, M.P. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*, v.7, p. 594-604, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976804> doi: 10.1016 / j.theriogenology.2008.09.034.

MITTAL, S.; DEVIREDDY, R.V. Desiccation tolerance of adult stem cells in the presence of trehalose and glycerol. *Open Biotech J.* v.2, p.211–8.2008. Disponível em: <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOBIOTJ-2-211> doi: 10.2174/1874070700802010211.

MOLINIA, F.C.; G. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.42, p.849-858, 1994. Disponível em [http://www.theriojournal.com/article/0093-691X\(94\)90453-P/abstract](http://www.theriojournal.com/article/0093-691X(94)90453-P/abstract) doi: 10.1016/0093-691X(94)90453-P.

NAJAFI, A.; ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; SHARAFI, M.; AKBARI SHARIF, A.; KHODAEI MOTLAGH, M.; MARTINEZ-PASTOR F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, v.66, p.275–282, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500077> doi: 10.1016 / j.cryobiol.2013.03.002.

NASCIMENTO, A.F.; MARIA, A.N.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.M.; VIVEIROS, A.T.M.. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim. Reprod. Sci.*, v.118 (2-4), p.324–329, 2010. Disponível em: [http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(09\)00184-5/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(09)00184-5/abstract) doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.07.002.

ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture*, v.311, p.241–247, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848610008148> doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.041.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; WEITZE, K.F.; BEYERBACH, M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* v.63, 2278-99, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826690> doi:10.1016/j.theriogenology.2004.10.008.

ROSATO M.P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, v.79, p.508-16, 2013. Disponível em: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(12\)00604-8/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(12)00604-8/abstract) doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.008.

SANCHEZ-PARTIDA, L.; MAXWELL, W.M.; PALEG, L.G.; SETCHELL, B.P. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction, fertility and development*. v.4, p.113-8, 1992. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/rd/RD9920113> doi: 10.1071/RD9920113.

SILVA, C.; CUNHA, E.R.; BLUME, G.R.; MALAQUIAS, J.V.; BÁO, S.N.; MARTINS, C.F. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, v.70, p.90-4, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25595634> doi:10.1016 / j.cryobiol.2015.01.001.

SORENSEN Jr., A.M. A laboratory for animal reproduction. American Press, v.4. p.153, 1979. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962004000300001 doi: 10.1590/S1413-95962004000300001.

STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v.37, p.46–58, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698429> doi:10,1006 / cryo.1998.2097.

TUNCER, P.B.; BUCAK, N.M.; SARIÖZKAN, S.; SAKIN, F.; YENI, D.; ÇIĞERCI, Í.H.; ATEŞŞAHİN, A.; AVDATEK, F.; GÜNDOĞAN, M.; BÜYÜKLEBLEBİCİ, O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology*. v.61, p.89-93, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.05.005> doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.05.005>.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T.JR.; STREIT, D.P.JR.; FIGUEIREDO, M.R. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, v.78, p.244-51, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578629> doi:10.1016 / j.theriogenology.2012.02.029.

VIVEIROS, A.T.; ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N.; ALLAMAN, I.B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*, v.112, p.293-300, 2009. Disponível em:

[http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(08\)00155-3/pdf](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(08)00155-3/pdf)

doi:1016/j.anireprosci.2008.04.025.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Phys Biochem*, v.35, p.137-50, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19189240> doi:10,1007 / s10695-008-9240-3.

VIVEIROS, A.T.M.; AMARAL, T.B.; ORFÃO, L.H; ISAÚ, Z.A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M.C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research*, v.42, p.858-865, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x/abstract> doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x

YOKOYAMA M.; AKIBA, H.; KATSUKI, M.; NOMURA, T. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Jikken Dobutsu*, v.39, p.125-8, 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2303089>

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGART, M. Tecnicas de inducao da reproducao de peixes migradores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.31, p.367-373. 2007. Disponível em: www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/367.pdf

Tabela 1: Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar lactose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM.

Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.

AVALIAÇÕES	LACTOSE			
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM
Mot. Total	33,1 ± 1,5 ^a	26,4 ± 1,7 ^b	29,3 ± 1,7 ^{ab}	30,6 ± 1,9 ^{ab}
Mot. Prog.	24,8 ± 1,3 ^a	18,9 ± 1,5 ^b	20,1 ± 1,7 ^b	22,2 ± 1,8 ^{ab}
Período Mot.	37,9 ± 6,5 ^a	41,7 ± 8,7 ^a	49,7 ± 7,3 ^a	29,5 ± 6,7 ^a
DAP	15,8 ± 0,9 ^a	13,2 ± 0,2 ^b	13,7 ± 0,2 ^b	13,5 ± 0,2 ^b
DCL	22,7 ± 1,9 ^a	17,4 ± 0,3 ^b	18,7 ± 0,6 ^b	18,0 ± 0,4 ^b
DSL	11,8 ± 0,8 ^a	9,6 ± 0,1 ^b	9,3 ± 0,1 ^b	9,4 ± 0,15 ^b
VAP	37,7 ± 2,3 ^a	31,6 ± 0,6 ^b	33,4 ± 0,6 ^{ab}	32,8 ± 0,7 ^b
VCL	54,3 ± 4,8 ^a	41,6 ± 0,9 ^b	45,5 ± 1,3 ^{ab}	43,8 ± 1,3 ^b
VSL	28,2 ± 1,9 ^a	22,8 ± 0,4 ^b	22,8 ± 0,4 ^b	22,9 ± 0,4 ^b
STR	0,7 ± 0,07 ^a	0,7 ± 0,09 ^a	0,6 ± 0,05 ^b	0,6 ± 0,08 ^b
LIN	0,5 ± 0,01 ^a	0,5 ± 0,01 ^a	0,5 ± 0,08 ^b	0,5 ± 0,01 ^{ab}
WOB	0,7 ± 0,01 ^{ab}	0,7 ± 0,08 ^a	0,7 ± 0,07 ^b	0,7 ± 0,08 ^{ab}
ALH	2,6 ± 0,09 ^c	2,9 ± 0,08 ^b	3,2 ± 0,08 ^a	3,0 ± 0,1 ^{ab}
BCF	23,1 ± 0,6 ^{ab}	23,9 ± 0,8 ^a	21,9 ± 0,3 ^{ab}	21,3 ± 0,4 ^b
Membrana	48,3 ± 3,5 ^a	46,4 ± 2,8 ^a	46,6 ± 2,9 ^a	48,7 ± 2,9 ^a
Mitocôndria	65,7 ± 4,5 ^b	74,7 ± 3,7 ^{ab}	78,8 ± 4,4 ^a	76,6 ± 3,5 ^{ab}
Fluidez	65,5 ± 5,4 ^a	51,9 ± 4,3 ^b	61,8 ± 4,3 ^{ab}	53,7 ± 4,1 ^{ab}
ROS	2928,4 ± 1843,5 ^a	352,0 ± 65,3 ^a	1721,3 ± 874,8 ^a	2033,1 ± 852,4 ^a
DNA	96,5 ± 0,2 ^a	96,2 ± 0,6 ^{ab}	94,3 ± 1,1 ^b	95,6 ± 0,4 ^{ab}

Motilidade total (Mot.Total), motilidade progressiva (Mot. Prog.), período de motilidade (Período Mot.), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), Velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), funcionalidade de membrana (Membrana), funcionalidade mitocondrial (Mitocôndria), fluidez de membrana (Fluidez), espécies reativas de oxigênio (ROS) e integridade de DNA (DNA), DMSO 10% (0 mM), lactose 50 mM + DMSO 10%, lactose 100 mM + DMSO 10%, lactose 150 mM + DMSO 10%. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($P < 0.05$).

Tabela 2: Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar trealose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM.

Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.

AVALIAÇÕES	TREALOSE			
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM
Mot. Total	31,8 ± 1,3 ^{ab}	35,5 ± 1,4 ^a	35,4 ± 1,7 ^a	30,6 ± 1,4 ^b
Mot. Prog.	23,6 ± 1,1 ^{ab}	26,7 ± 1,4 ^a	26,2 ± 1,7 ^a	22,4 ± 1,4 ^b
Período Mot.	32,6 ± 5,7 ^b	50,0 ± 5,8 ^a	43,7 ± 6,0 ^{ab}	40,4 ± 6,6 ^{ab}
DAP	15,2 ± 0,7 ^a	13,5 ± 0,2 ^b	12,7 ± 0,2 ^b	12,6 ± 0,2 ^b
DCL	21,4 ± 1,6 ^a	17,5 ± 0,3 ^b	16,9 ± 0,3 ^b	16,7 ± 0,3 ^b
DSL	11,4 ± 0,6 ^a	9,7 ± 0,2 ^b	9,0 ± 0,1 ^b	9,1 ± 0,1 ^b
VAP	36,2 ± 1,9 ^a	32,2 ± 0,6 ^b	30,4 ± 0,6 ^b	30,1 ± 0,5 ^b
VCL	51,1 ± 3,9 ^a	41,9 ± 0,8 ^b	40,5 ± 0,9 ^b	39,8 ± 0,8 ^b
VSL	27,1 ± 1,6 ^a	23,2 ± 0,5 ^b	21,6 ± 0,3 ^b	21,5 ± 0,3 ^b
STR	0,7 ± 0,06 ^a	0,7 ± 0,05 ^b	0,7 ± 0,06 ^b	0,7 ± 0,06 ^b
LIN	0,5 ± 0,09 ^a	0,5 ± 0,08 ^a	0,5 ± 0,08 ^a	0,5 ± 0,08 ^a
WOB	0,7 ± 0,09 ^a	0,7 ± 0,05 ^a	0,7 ± 0,07 ^a	0,7 ± 0,06 ^a
ALH	2,5 ± 0,08 ^a	2,7 ± 0,07 ^a	2,5 ± 0,08 ^a	2,6 ± 0,08 ^a
BCF	22,7 ± 0,5 ^a	22,4 ± 0,2 ^a	21,8 ± 0,3 ^{ab}	21,3 ± 0,3 ^b
Membrana	49,2 ± 2,8 ^a	54,6 ± 2,1 ^a	49,9 ± 3,4 ^a	52,0 ± 3,2 ^a
Mitocôndria	70,6 ± 4,14 ^a	77,4 ± 3,4 ^a	74,4 ± 2,8 ^a	73,5 ± 3,8 ^a
Fluidez	64,4 ± 4,7 ^a	62,4 ± 3,3 ^a	60,0 ± 3,7 ^a	63,4 ± 3,8 ^a
ROS	2963,7 ± 1436,1 ^a	461,86 ± 111,9 ^b	368,0 ± 44,1 ^b	1515,1 ± 563,94 ^{ab}
DNA	96,5 ± 0,2 ^{ab}	95,5 ± 0,6 ^b	95,5 ± 0,6 ^b	97,4 ± 0,2 ^a

Motilidade total (Mot.Total), motilidade progressiva (Mot. Prog.), período de motilidade (Período Mot.), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), Velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), funcionalidade de membrana (Membrana), funcionalidade mitocondrial (Mitocôndria), fluidez de membrana (Fluidez), espécies reativas de oxigênio (ROS) e integridade de DNA (DNA), DMSO 10% (0 mM), trealose 50 mM + DMSO 10%, trealose 100 mM + DMSO 10%, trealose 150 mM + DMSO 10%. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($P < 0.05$).

Tabela 3: Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar sacarose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM.

Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.

AVALIAÇÕES	SACAROSE			
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM
Mot. Total	32,2 ± 1,4 ^{ab}	32,3 ± 1,3 ^{ab}	35,2 ± 1,2 ^a	30,9 ± 1,6 ^b
Mot. Prog.	23,9 ± 1,2 ^{ab}	22,9 ± 1,3 ^{ab}	26,2 ± 1,2 ^a	21,7 ± 1,6 ^b
Período Mot.	34,7 ± 6,3 ^a	39,3 ± 7,2 ^a	44,7 ± 5,5 ^a	39,5 ± 7,7 ^a
DAP	15,5 ± 0,8 ^a	13,2 ± 0,2 ^b	13,2 ± 0,1 ^b	13,9 ± 0,2 ^b
DCL	22,1 ± 1,8 ^a	17,8 ± 0,3 ^b	17,5 ± 0,2 ^b	18,7 ± 0,3 ^b
DSL	11,5 ± 0,7 ^a	9,3 ± 0,1 ^b	9,2 ± 0,1 ^b	9,6 ± 0,1 ^b
VAP	37,0 ± 2,1 ^a	32,0 ± 0,5 ^b	31,8 ± 0,4 ^b	34,0 ± 0,5 ^{ab}
VCL	53,0 ± 4,3 ^a	43,1 ± 1,0 ^b	42,2 ± 0,7 ^b	45,5 ± 0,9 ^b
VSL	27,5 ± 1,8 ^a	22,5 ± 0,3 ^b	22,2 ± 0,2 ^b	23,7 ± 0,3 ^b
STR	0,7 ± 0,06 ^a	0,7 ± 0,06 ^b	0,6 ± 0,06 ^b	0,6 ± 0,06 ^b
LIN	0,5 ± 0,09 ^a	0,5 ± 0,08 ^b	0,5 ± 0,08 ^b	0,5 ± 0,08 ^b
WOB	0,7 ± 0,01 ^a	0,7 ± 0,06 ^a	0,7 ± 0,05 ^a	0,7 ± 0,06 ^a
ALH	2,6 ± 0,08 ^c	3,0 ± 0,07 ^b	2,8 ± 0,06 ^{bc}	3,2 ± 0,07 ^a
BCF	22,9 ± 0,5 ^a	21,9 ± 0,3 ^{ab}	21,6 ± 0,2 ^b	22,5 ± 0,3 ^{ab}
Membrana	48,3 ± 3,1 ^{ab}	43,3 ± 3,2 ^b	41,8 ± 3,0 ^b	55,4 ± 2,0 ^a
Mitocôndria	68,4 ± 4,5 ^b	82,8 ± 3,0 ^a	82,6 ± 2,8 ^a	82,5 ± 3,6 ^a
Fluidez	67,2 ± 5,0 ^a	62,0 ± 3,4 ^a	62,1 ± 3,9 ^a	69,9 ± 3,7 ^a
ROS	2648,8 ± 1665,5 ^a	576,5 ± 155,2 ^{ab}	1879,0 ± 622,0 ^{ab}	323,7 ± 56,2 ^b
DNA	96,7 ± 0,2 ^a	96,1 ± 0,4 ^a	94,9 ± 0,5 ^a	132,0 ± 36,0 ^a

Motilidade total (Mot.Total), motilidade progressiva (Mot. Prog.), período de motilidade (Período Mot.), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), Velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), funcionalidade de membrana (Membrana), funcionalidade mitocondrial (Mitocôndria), fluidez de membrana (Fluidez), espécies reativas de oxigênio (ROS) e integridade de DNA (DNA), DMSO 10% (0 mM), sacarose 50 mM + DMSO 10%, sacarose 100 mM + DMSO 10%, sacarose 150 mM + DMSO 10%. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($P < 0.05$).

Tabela 4: Análise dos parâmetros cinéticos e de funcionalidade das organelas sob influência da associação do DMSO 10% ao açúcar rafinose nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM.

Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.

AVALIAÇÕES	RAFINOSE			
	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM
Mot. Total	32,2 ± 1,3 ^b	23,6 ± 1,6 ^c	37,3 ± 1,8 ^a	28,0 ± 1,3 ^c
Mot. Prog.	24,2 ± 1,2 ^a	15,6 ± 1,5 ^b	27,6 ± 1,8 ^a	19,4 ± 1,2 ^b
Período Mot.	38,0 ± 5,9 ^a	52,4 ± 7,2 ^a	52,4 ± 6,2 ^a	45,2 ± 8,1 ^a
DAP	15,4 ± 0,8 ^a	12,9 ± 0,2 ^b	13,8 ± 0,8 ^{ab}	12,8 ± 0,2 ^b
DCL	21,7 ± 1,7 ^a	17,0 ± 0,5 ^b	18,0 ± 0,3 ^b	16,9 ± 0,3 ^b
DSL	11,5 ± 0,7 ^a	9,4 ± 0,1 ^b	9,8 ± 0,3 ^b	9,3 ± 0,1 ^b
VAP	36,6 ± 2,0 ^a	31,0 ± 0,8 ^b	33,0 ± 0,7 ^{ab}	30,5 ± 0,6 ^b
VCL	51,7 ± 4,1 ^a	40,7 ± 1,3 ^b	43,2 ± 0,9 ^b	40,3 ± 0,9 ^b
VSL	27,4 ± 1,7 ^a	22,5 ± 0,5 ^b	23,4 ± 0,6 ^b	22,0 ± 0,4 ^b
STR	0,7 ± 0,06 ^a	0,7 ± 0,09 ^{ab}	0,7 ± 0,08 ^b	0,7 ± 0,07 ^a
LIN	0,5 ± 0,09 ^a	0,5 ± 0,01 ^a	0,5 ± 0,01 ^a	0,5 ± 0,01 ^a
WOB	0,7 ± 0,01 ^a	0,7 ± 0,09 ^a	0,7 ± 0,07 ^a	0,7 ± 0,08 ^a
ALH	2,5 ± 0,09 ^c	3,0 ± 0,1 ^{bc}	2,8 ± 0,08 ^{ab}	2,6 ± 0,09 ^a
BCF	22,7 ± 0,5 ^{ab}	23,8 ± 0,7 ^{ab}	21,6 ± 0,3 ^b	22,3 ± 0,4 ^a
Membrana	49,8 ± 3,3 ^a	52,8 ± 2,3 ^a	47,9 ± 3,1 ^a	44,5 ± 4,2 ^a
Mitocôndria	68,6 ± 4,5 ^a	74,8 ± 3,2 ^a	70,3 ± 4,3 ^a	66,6 ± 4,7 ^a
Fluidez	65,8 ± 4,9 ^a	63,6 ± 3,0 ^a	64,7 ± 4,1 ^a	61,5 ± 3,6 ^a
ROS	3515,1 ± 1702,9 ^a	1161,4 ± 553,5 ^a	5378,6 ± 3449,0 ^a	484,9 ± 99,4 ^a
DNA	96,3 ± 0,2 ^a	97,3 ± 0,1 ^a	96,4 ± 0,3 ^a	96,0 ± 0,3 ^a

Motilidade total (Mot.Total), motilidade progressiva (Mot. Prog.), período de motilidade (Período Mot.), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), Velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), funcionalidade de membrana (Membrana), funcionalidade mitocondrial (Mitocôndria), fluidez de membrana (Fluidez), espécies reativas de oxigênio (ROS) e integridade de DNA (DNA), DMSO 10% (0 mM), rafinose 50 mM + DMSO 10%, rafinose 100 mM + DMSO 10%, rafinose 150 mM + DMSO 10%. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($P < 0.05$).

3 Considerações Finais

Neste estudo foi possível compreender características importantes para criopreservação seminal de peixes, no caso do *Piaractus mesopotamicus*, uma vez que por ter sido o primeiro a utilizar açúcares como crioprotetores para espermatozoides desta espécie, foi possível estabelecer quais açúcares podem ter eficiência crioprotetora à sua célula espermática.

Considerando os parâmetros cinéticos essenciais na criopreservação espermática, os resultados das avaliações de período de motilidade e motilidade total apresentaram suas melhores taxas no tratamento contendo rafinose 100 mM associado ao DMSO 10%.

Com tudo, é possível afirmar, que o desenvolvimento de estudos como este, é de grande importância ecológica e econômica, garantindo uma variabilidade genética de qualidade, uma vez que tais animais possuem ampla exploração, podendo ser ameaçados de extinção.

Referências

ABIMORAD, E.G.; SQUASSONI, G.H.; CARNEIRO, D.J. Apparent digestibility of protein and amino acid in some selected feed ingredients for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquacult. Nutr.** v.14, p.374–380. 2008.

ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245-50, 2003.

AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p.239-249, 2005.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.

AISEN, E.; ÁLVAREZ, H.; VENTURINO, A.; LARREGUY, D. Efecto comparativo de los diluyes conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación de semen ovino. **Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal**, v.10, p.233-31, 1995.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.

BABIÁK, I.; GLOGOWSKI, J.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H.; STRZEZEK, J.; DEMIANOWICZ, W. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.177-192, 2001.

BADR, M.R.; MARY, G.A.; HASSAN, M.H. Effect of trehalose on Cryopreservation, Oxidative Stress and DNA Integrity of Buffalo Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.1, p.50-57, 2010.

BILLARD R.; COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **J. Exp. Zool.**, v.31, p.261:122, 1992.

BILODEAU, J.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.282–288, 2000.

CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, L.; RANA, K.J.; HERRAEZ, M.P. Sublethal Damage during Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. **Cryobiology**, v.37, p.245–253, 1998.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CUÑADO, S.; WALLACE, J.C.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M.P. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. **Cryobiology**, v.50, p.273–284, 2005.

CARNEIRO, P.C.F.; AZAVEDO, H.C.; SANTOS, P.J; MARIA, A.N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryo Letters**, v.33(5), p.385-393, 2012.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31(3), p.361-366, 2007.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.472-89, 2003.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu *Colossoma mitrei* (BERG, 1895). **Boletim Técnico do CEPTA**, p.26, 1985.

Chao, N.; Liao, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161–189, 2001.

CHATTERJEE S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Mol Reprod Dev.**, v.59(4), p.451-8, 2001.

CORCUERA, B.; MARIGORTA, P.; SAGÜÉS, A.; SAIZ-CIDONCHA, F.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. **Theriogenology** v.67, p.1150-7, 2007.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annu. Rev. Physiol**, v.60, p.73–103, 1998.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.393-403, 2011.

EL-BADR, M.R.; MARY, G.; ABD, E.M.; HASSAN, M.H. Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. **J Reprod. Infertil**. v.1, p.50–7. 2010.

EROGLU, A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. **Cryobiology**, v.60, p.S54–S59, 2010.

FARSHAD, A. & AKHONDZADEH, S. Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **J. Anim. Sci**. v.21, p.1721-1727, 2008.

FELIZARDO, V.O; MELLO, R.A; MURGAS, L.D.S; ANDRADE, E.S; DRUMOND, M.M; ROSA, P.V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction**, v.122, p.259–263, 2010.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v.80, p.400–410, 2013.

FIGUEROA, E.;MERINO, O.; RISOPATRÓN, J.; ISACHENKO, V.; SÁNCHEZ, R.; EFFER, B.; ISACHENKO, E.; FARIAS, J.G.; VALDEBENITO,I. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. **Theriogenology**, v.83(2), p.238–245, 2015.

GLOGOWSKI, J.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. **North American Journal of Aquaculture**, v. 61, p.258-262, 1999.

IAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; PINA ROSATO, M. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: dimethyl acetamide versus dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v.78, p.1381-1389, 2012.

JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M.J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v.96, p.58-63, 2011.

JENKINS, J.A.; DRAUGELIS-DALE, R.O.; PINKNEY, A.E.; IWANOWICZ, L.R.; BLAZER, V.S. Flow cytometric method for measuring chromatin fragmentation in fixed sperm from yellow perch (*Perca flavescens*). **Theriogenology**, v.83, p.920–931, 2015.

JOMORI, R.K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Stable carbon (d13C) and nitrogen (d15N) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquac. Res.** v.39, p.370–381. 2008.

KOZDROWSKI R. The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** v.116, p.326–34, 2009.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta* f. *fariorum* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp. **Aquaculture Research**, v.26, p.801-7, 1995.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113–141, 2000.

LIU, Q.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, X.; XU, S.; MA, D.; XIAO, Z.; XIAO, Y.; LI, J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. **Fish Physiol Biochem**, v.41, p.413–422, 2015.

LOI, P.; MATSUKAWA, K.; PTAK, G.; CLINTON, M.; FULKA JR, J. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. **PLoS One**, v.3, p.2978, 2008.

MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.29, p.459–467, 2008.

MARIA, A.N.; VIVEIROS A.T.M.; FREITAS, R.T.F.; OLIVEIRA, A.V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v.260, p.298–306, 2006.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GÓMEZ-ROMANO, F.; BLANCO, G.; SÁNCHEZ, J.A.; HERRÁEZ, M.P. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, v.7, p. 594-604, 2009.

MITTAL, S.; DEVIREDDY, R.V. Desiccation tolerance of adult stem cells in the presence of trehalose and glycerol. **Open Biotech J.** v.2, p.211–8.2008.

MOCÉA, E.; VICENTE, J.S. Rabbit sperm cryopreservation: A review. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.1–24, 2009.

MOLINIA, F.C.; G. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p.849-858, 1994.

NAJAFI, A.; ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; SHARAFI, M.; AKBARI SHARIF, A.; KHODAEI MOTLAGH, M.; MARTINEZ-PASTOR F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in soybean lecithin-based extender. **Cryobiology**, v.66, p.275–282, 2013.

NASCIMENTO, A.F.; MARIA, A.N.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.M.; VIVEIROS, A.T.M.. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Anim. Reprod. Sci.**, v.118 (2-4), p.324–329, 2010.

NICOLAJSEN, H.; HVIDT, A. Phase behavior of the system trehalose-NaCl-Water. **Cryobiology**, v.31, p.199-205, 1994.

OGIER DE BAULNY, B.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D.; MAISSE, G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Cryobiology**, v.34, p.141-149, 1997.

ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, v.311, p.241–247, 2011.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; WEITZE, K.F.; BEYERBACH, M.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v.63, p.2278-99, 2005.

PIASSI, L.M.; CORCINI, C.D.; PANZARDI, A.; VARELA JUNIOR, A.S.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C. Efeito de crioprotetores impermeáveis sobre a viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de camundongos (*Mus musculus*) das linhagens swissalbina e balb/c. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, 2009.

ROSATO M.P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, v.79, p.508-16, 2013.

SANCHEZ-PARTIDA, L.; MAXWELL, W.M.; PALEG, L.G.; SETCHELL, B.P. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. **Reproduction, fertility and development**. v.4, p.113-8, 1992.

SILVA, C.; CUNHA, E.R.; BLUME, G.R.; MALAQUIAS, J.V.; BÁO, S.N.; MARTINS, C.F. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. **Cryobiology**, v.70, p.90-4, 2015.

SORENSEN Jr., A.M. A laboratory for animal reproduction. **American Press**, v.4. p.153, 1979.

STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v.37, p.46–58, 1998.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNER, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, v.70, p.233-240, 2008.

TSELKAS, K.; SARATSIS, P.H.; KARAGIANIDIS, A.; SAMOUILIDIS, S. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.** v.107, p.41–80, 2000.

TUNCER, P.B.; BUCAK, N.M.; SARIÖZKAN, S.; SAKIN, F.; YENI, D.; ÇİĞERCI, İ.H.; ATEŞŞAHİN, A.; AVDATEK, F.; GÜNDOĞAN, M.; BÜYÜKLEBLEBİCİ, O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. **Cryobiology.** v.61, p.89-93, 2010.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T.JR.; STREIT, D.P.JR.; FIGUEIREDO, M.R. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology,** v.78, p.244-51, 2012.

VIVEIROS, A.T.; ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N.; ALLAMAN, I.B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science,** v.112, p.293-300, 2009.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Phys Biochem,** v.35, p.137-50, 2009.

VIVEIROS, A.T.M.; AMARAL, T.B.; ORFÃO, L.H.; ISAÚ, Z.A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M.C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research,** v.42, p.858-865, 2011.

YOKOYAMA M.; AKIBA, H.; KATSUKI, M.; NOMURA, T. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. **Jikken Dobutsu,** v.39, p.125-8, 1990.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGART, M. Técnicas de inducao da reproducao de peixes migradores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.31, p.367–373. 2007.