



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



**Amidas na criopreservação seminal de Peixe-rei,
Odontesthes bonariensis.**

Juliana do Prado Alves

Orientador: Prof^o Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Rio Grande
2014



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



Amidas na criopreservação seminal de Peixe-rei, *Odontesthes bonariensis*

Aluno: Juliana do Prado Alves

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior

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

Dedico esse trabalho aos meus pais, Graça Alves e Rolmar Alves (*in memoriam*), aos meus irmãos, Milena Alves e Leandro Alves, ao meu cunhado João Peres e a minha sobrinha Joana Peres, por todo amor, paciência e apoio durante mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda fé, força e coragem para seguir em frente sempre, por maior que fosse a dificuldade;

À minha mãe, Graça, pelo amor incondicional. Por ter sido sempre meu porto seguro e referência maior de garra... Meu muito obrigada! Te amo, hoje e sempre;

Ao meu pai, Rolmar... Por ser o meu anjo há quatro anos. Eu sei que onde estás, continuas me protegendo e me guiando pelos melhores caminhos! Te amo, hoje e sempre;

À minha irmã, amiga e segunda mãe, Milena. Te amo! Obrigada por existires na minha vida;

Ao meu irmão Leandro! Te amo... Obrigada por existires na minha vida;

Ao meu cunhado João, por ser mais que um cunhado. Por ser o irmão mais velho que não tive. Muito obrigada!

À minha sobrinha/afilhada/filha... És muito pequena pra entenderes, mas participastes dos momentos mais importantes e decisivos dessa jornada. A dinda te ama!

À minha família (família Buscapé), tios, tias, primos, primas, vó e piolhos pegados.... Em especial a minha tia Jania e ao meu tio Domingos que estão só pela festa de comemoração da defesa hehehe! Muito obrigada!

Aos professores da Pós Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais por todos os ensinamentos durante esses dois anos de curso;

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

Ao meu orientador Antonio Sergio Varela Junior, por ter sido meu amigo além de orientador. Muito obrigada!

À professora Carine Corcini, pela ajuda na execução desse trabalho e por desculpar todas as horas nas quais “segurei” o Antonio Sergio até mais tarde na FURG! Muito obrigada!

Às minhas amigas do grupo RAC (Reprodução Animal Comparada), por todo o apoio, amizade, risadas, chimarrões e tudo mais. Tooooooodas foram muito importantes pra mim! P.S.: minhas xuxus!

Aos (as) estagiários (as) do grupo RAC, por serem estagiários e amigos exemplares, em especial à Clarissa, Luiza e Joziel. Muito obrigada!

À minha amiga Estela Fernandes por toda ajuda tanto nesse trabalho como em outras tantas dificuldades encontradas no meio do percurso! Muito obrigada! Esse trabalho também é teu!

À minha amiga Tainã Cardoso que, mesmo na Espanha, sempre esteve “aqui” para me ajudar! Muito obrigada!

Às minhas amigas Fernanda Alves e Janaina Camacho, por ficarem os últimos segundos antes da entrega da dissertação, me ajudando e me acalmando! Muito obrigada!

À galera da salinha da Pós, em especial ao Jean, Luís, Gabo, Mari e Bagé...! Minhas manhãs e tardes não teriam graça sem vocês! Muito obrigada!

Às minhas amigas/irmãs Gabi e Pri, que me comprovaram que amigos são irmãos que Deus nos permite escolher! Muito obrigada!

Às minhas amigas e amigos do BAC, Suzana, Dani diva, Brisoca, Cinthia, Roger, Pena, Cibi, Dani.... Muito obrigada!

Aos meus amigos de outras jornadas, Leticia, Renan, Paulo e Taina, pela amizade verdadeira comprovando que não é preciso estar junto para se estar perto. Muito obrigada!

Aos amigos que conquistei em outros programas de pós-graduação. Laila, Analu, Thaisa, Andrea, Marie, Diego... Muito obrigada! As festas no Cassino não teriam graça sem vocês!

Ao pessoal do laboratório dos crustáceos, pelo acolhimento e parceria. Muito obrigada!

Às minhas amigas “fora FURG”, Carolzinha, Lita, Valéria, Marcinha, Nicole, Carol Silva... Por desculparem minha ausência e pela força de sempre! Muito obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABELAS	x
INTRODUÇÃO GERAL	11
Ecossistemas Aquáticos Continentais	11
Lagoa Mangueira.....	11
Gênero <i>Odontesthes</i> (Peixe-rei)	13
Criopreservação seminal	14
REFERENCIAS	17
CAPÍTULO 1	24
Amidas na criopreservação seminal de Peixe-rei, <i>Odontesthes bonariensis</i>	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS.....	40

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos continentais são um exemplo de ecossistema de água doce, compreendendo rios, reservatórios, lagoas e áreas alagáveis. A planície costeira do Rio Grande do Sul possui três grandes corpos d'água continentais, dentre eles a Lagoa Mangureira é a terceira maior. Na Lagoa Mangureira encontra-se várias espécies de peixes, o *Odontesthes bonariensis* (peixe-rei) está entre as espécies mais abundantes da Lagoa. Essa espécie é nativa tendo importância no fluxo de nutrientes e nas estruturas tróficas do ambiente, além da grande importância econômica na região. Uma das possibilidades de manter a variabilidade genética, possibilitando proteger ou até mesmo recuperar espécies de peixe-rei, é a técnica de criopreservação seminal que consiste em resfriar e/ou congelar espermatozoides, utilizando diluentes e crioprotetores específicos. O presente estudo testou três tipos de amidas, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF) e metilformamida (MF) nas concentrações de 2, 5, 8 e 11%, tendo como controle o dimetilsulfoxido na concentração de 10% (DMSO). Cada tratamento foi diluído em *Mounib* modificado. Foi avaliada a motilidade (taxa e tempo) e as estruturas celulares (integridade de membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, índice de fragmentação de DNA e fluidez de membrana plasmática). O DMSO 10% e a MF 8% obtiveram melhores resultados em relação à integridade de membrana plasmática (34, 8% e 29%), funcionalidade de mitocôndria (19,8% e 16,2%) e fluidez de membrana plasmática (39,4% e 46,4%), além disso, a taxa de motilidade (11,8% e 10%) e o tempo de motilidade (81,4 seg. e 71,8 seg.) mantiveram-se entre as melhores médias. Dessa forma, considerando os parâmetros avaliados, o DMSO10% e a MF8% foram associados à melhor criopreservação das células espermáticas de *O. bonariensis*.

Palavras-chave: Ecossistemas aquáticos, Lagoa Mangureira, motilidade, estruturas celulares.

ABSTRACT

The freshwater ecosystems are an example of freshwater ecosystem, comprising rivers, reservoirs, ponds and wetlands. The coastal plain of Rio Grande do Sul has three major continental water bodies, including the Mangueira Lagoon is the third largest. In Mangueira Lagoon is several species of fish, the *Odontesthes bonariensis* (pejerrey) is among the most abundant species of Lagoa. This species is native having importance in the flow of nutrients and trophic structures in the environment, in addition to the great economic importance in the region. One possibility to maintain genetic variability, enabling protect or even recover species of kingfish, is the seminal cryopreservation technique of cooling and / or freeze sperm, using specific diluents and cryoprotectants. The present study tested three kinds of amides, dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF) and dimethylformamide (MF) at concentrations of 2, 5, 8 and 11%, with the control dimethylsulfoxide at a concentration of 10% (DMSO). Each treatment was diluted in modified *Mounib*. Motility was assessed (rate and time), and cell structures (plasma membrane integrity, mitochondrial function, DNA fragmentation index and fluidity of the plasma membrane). The 10% DMSO and MF 8% did better on the completeness of the plasma membrane (34.8% and 29%), functional mitochondria (19.8% and 16.2%) and plasma membrane fluidity (39.4% and 46.4%), furthermore, the motility rates (11.8% and 10%) and the motility of time (81.4 s. and 71.8 s.) remained among the best averages. Thus, considering the parameters evaluated, the DMSO10% and MF8% were associated with better cryopreservation of sperm cells of *O. bonariensis*.

Key-words: aquatic ecosystems, Mangueira Lagoon, motility, cell structures.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliações espermáticas pós-descongelamento de sêmen de *O. bonariensis*: Integridade de Membrana (IM) Índice de Fragmentação do DNA (IFDNA) e Funcionalidade de Mitocôndria (FM) em tratamentos com crioprotetores – Média e Erro Padrão (n=11 ejaculados).

Tabela 2 – Avaliações espermáticas pós-descongelamento de sêmen de *O. bonariensis*: Fluidez Membrana Plasmática (FLU), Taxa de Motilidade (TxM) e Tempo de Motilidade (Tempo/Mot) – Média e Erro Padrão (n=11 ejaculados).

INTRODUÇÃO GERAL

Ecosistemas Aquáticos Continentais

Ecosistemas são sistemas ecológicos complexos e grandes, incluindo milhares de diferentes tipos de organismos vivendo em uma grande variedade de meios individuais [1]. Dentre os ecossistemas existentes no Planeta Terra, os aquáticos são os mais abundantes, compreendendo mais que a metade da superfície terrestre, na qual 70% são de água salgada e, apenas 1% de água doce [2]. Uma importante parcela desses ecossistemas de água doce são os ecossistemas aquáticos continentais compreendendo os rios, riachos, reservatórios, lagos, lagoas e áreas alagáveis [3].

Mesmo que apenas 1% dos ambientes aquáticos seja de água doce (com salinidade igual ou inferior a 0,5%) [4] esses ecossistemas são de suma importância para o funcionamento dos ciclos biogeoquímicos, como por exemplo, o da água (evapotranspiração, evaporação e precipitação), estabelecendo assim, a distribuição espacial e os números desses corpos d'águas interiores [5].

Os ecossistemas aquáticos continentais possuem inúmeras importâncias econômicas, sociais e culturais [6], além de oferecerem a água, subsídio essencial e fundamental para a vida e sobrevivência de todas as espécies na Terra [7].

Esses corpos d'águas continentais são fundamentais para a biodiversidade regional, além de contribuírem com espécies somente ali encontradas. Essa riqueza de biodiversidade também se dá pela capacidade que esses ecossistemas possuem em suportar diferentes comunidades [8]. Estima-se que aproximadamente 12% da fauna encontram-se nesses ecossistemas de água doce [9].

Porém, esses ecossistemas são muito suscetíveis a impactos antrópicos como consequência da rápida urbanização, através de mudanças climáticas em função do aquecimento global, entre outros fatores [6].

Além disso, a exploração demasiada de seus recursos hídricos, a sobre-exploração de seus recursos bióticos e a introdução de espécies exóticas tem aumentado o risco de perda desses ambientes [10].

Lagoa Mangueira

O Brasil é um país com uma grande abundância de Lagos e/ou Lagoas, podendo ser agrupados em cinco grupos bem distintos: sistemas de lagos formados pela atividade de rios,

sistemas de lagos do Pantanal Matogrossense, sistemas de lagos Amazônicos, represas e açudes e sistemas de lagos e lagoas costeiras [11].

Neste último grupo, encontra-se a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, que além de ser banhada pelo Oceano Atlântico, possui uma vasta área de corpos de água internos, nos quais estão presentes três grandes Lagoas: A Lagoa dos Patos, Lagoa Mirim e Lagoa mangueira [12].

A Lagoa Mangueira é o terceiro grande corpo d'água da planície costeira do Rio Grande do Sul, localiza-se no município de Santa Vitória do Palmar, entre as coordenadas $32^{\circ}47'10''$ e $33^{\circ}31'30''$ de latitude sul e a $52^{\circ}47'10''$ de longitude oeste e possui um comprimento de aproximadamente 92km por 7,6Km de largura [12]. Sua porção norte fica situada no sistema hidrográfico do Taim que é uma zona de ambiente alagável, tendo no verão porções alagadas misturadas com vegetação e, permanecendo praticamente submersa nos invernos chuvosos [13, 14] (Figura 1).

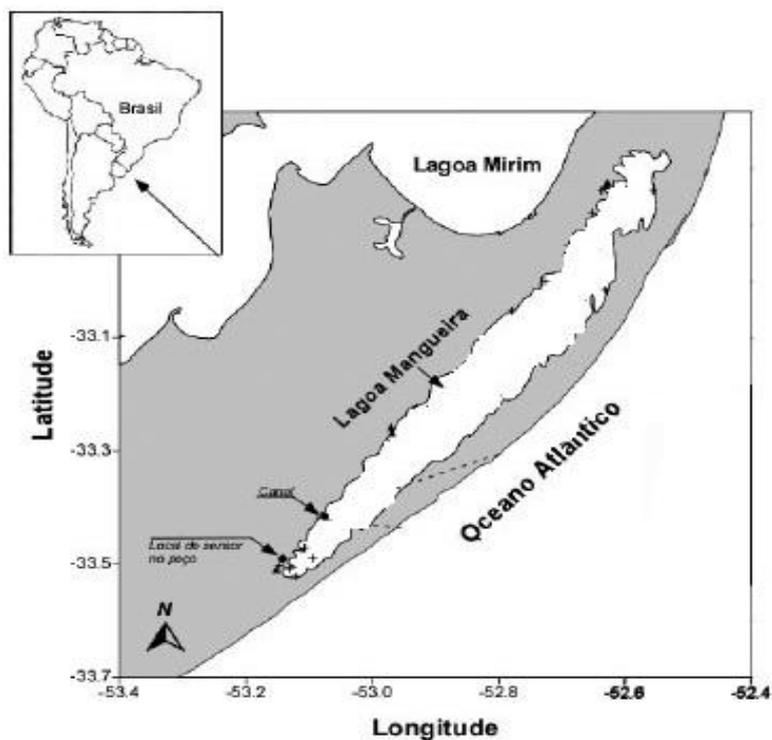


Figura 1: Localização da Lagoa mangueira, Rio Grande do Sul – RS, Brasil (fonte: adaptado de Andrade et al., 2012) [15]

Estudos já foram feitos com algumas espécies de animais nativos da Lagoa mangueira, com enfoque na genética e hábitos alimentares de peixes e ecologia reprodutiva de cágados [16-18, 13]. Segundo Artioli [13], a Lagoa Mangueira abriga 52 espécies de peixes, sendo as famílias Characidae (lambari), Cichlidae (cará), Loricariidae (cascudo) e Atherinopsidae

(peixe-rei) as mais representativas. Porém, os estudos relacionados à fauna nativa da Lagoa mangueira são ainda escassos, tornando-se necessário trabalhos mais específicos para que estes possam ser voltados à preservação ecológica desse ambiente e da diversidade de espécies que ali vivem, como as espécies de peixe-rei.

Gênero *Odontesthes* (Peixe-rei)

Em 2003, Reis e colaboradores [19] realizaram um levantamento da quantidade de espécies de peixes encontrados nos ambientes de água doce, e verificou aproximadamente 4.475 espécies descritas e aproximadamente 1.550 de espécies ainda não descritas, totalizando 6.025 espécies nesses ambientes, sendo que 2.300 dessas espécies são encontradas em território brasileiro.

Além de movimentar a economia através da pesca e comercialização, os peixes possuem grande importância na manutenção da qualidade da água de um ambiente. Isso se dá pelas interações que ocorrem entre eles, invertebrados e algas, contribuindo, de certa forma, para a dinâmica de nutrientes de um ecossistema aquático [20]. Os peixes também são bons exemplos de bioindicadores ambientais demonstrando a saúde do local onde estão inseridos através de sua distribuição, dominância, ausência e desaparecimento [21].

O peixe-rei (*Odontesthes*) é de grande importância ecológica e comercial, esse gênero possui sete espécies que ocorre no extremo sul, sendo elas *O. bonariensis* (Valenciennes, 1835), *O. humensis* (De Buen, 1953), *O. retropinnis* (De Buen, 1953), *O. mirinensis* (Bemvenuti, 1995), *O. perugiae* (Evermann & Kendall, 1906), *O. incisa* (Jenyns, 1842) e *O. argentinensis* (Valenciennes, 1835). Apenas as espécies *O. incisa* e *O. argentinensis* não habitam ambientes de água doce [22]. Nas lagoas do Rio grande do Sul, Brasil, a espécie mais comum é a *Odontesthes bonariensis* [23] que pertence a ordem dos Atheriniformes, família Atherinopsidae [20] e apresenta, de forma geral, algumas características, como por exemplo, corpo espesso e relativamente curto, com marca curva ventral, cabeça longa com extremidade proeminente e ligeiramente convexa para cima, e boca excessivamente prostrátil [17].

A espécie *O. bonariensis* possui sua diferenciação sexual fortemente dependente da temperatura da água onde está inserido durante as primeiras semanas após a eclosão, sendo que temperaturas mais baixas (aprox. entre 13 a 19 °C) diferenciam-se em fêmeas. Dessa forma, entre os demais peixes, os *O. bonariensis* podem ser considerados bons indicadores biológicos do ambiente por possuírem sua produção de gametas influenciada com o aumento e diminuição da temperatura ambiental [24, 25].

Os *Odontesthes*, de maneira geral, possuem um ciclo reprodutivo sazonal com grandes desovas na primavera [26, 27], seus ovos são bentônicos com filamentos que servem para aderir ao substrato [28]. De um modo geral, as fêmeas possuem tamanho do corpo maior que o tamanho do corpo dos machos, provavelmente essa variável esteja relacionada com o cuidado parental das fêmeas [29].

Alguns estudos já foram feitos com o gênero *Odontesthes*, como a diferenciação morfológica e óssea entre as espécies e biologia reprodutiva [30, 22, 29]. Além disso, estudos com a espécie *O. bonariensis* demonstraram a bioacumulação de metais pesados através das brânquias e fígado [31], respostas fisiológicas a diferentes salinidades [32], diferenciação sexual e crescimento [33], hábito alimentar [17].

Porém, a biologia reprodutiva da espécie *O. bonariensis* é pouco conhecida, tendo relatos mais específicos no que se refere a diferenciação sexual e estudos que analisam a endocrinologia envolvida na reprodução [33, 34]. Nesse contexto, torna-se necessário o investimento em estudos que contribuam para a compreensão e manipulação da reprodução dos peixes *O. bonariensis*.

Criopreservação seminal

A fim de auxiliar na manutenção de espécies como o *O. bonariensis* a criopreservação mostra-se interessante, pois através desta técnica é possível reduzir o metabolismo celular permitindo a volta do metabolismo normal após o descongelamento, mesmo durante longos períodos de armazenamento [35].

A criopreservação seminal, que potencializa a inseminação artificial, colabora para a diminuição dos custos de criação com a manutenção, melhoria na seleção e difusão de material genético [36], além de atender, através de banco de germoplasma, a conservação da variabilidade genética dos animais [37] possibilitando proteger ou até mesmo recuperar espécies em extinção. Outra finalidade do banco de germoplasma é a utilização desse material para caracterizar geneticamente as espécies e descrever sua filogenia [38].

Embora essa técnica venha alcançando resultados promissores no congelamento de sêmen de diversas espécies [39-42], a criopreservação causa danos estruturais e funcionais nas células criopreservadas denominados crioinjúrias. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um dos fatores que contribuem com esses danos celulares [43].

Além disso, durante a criopreservação, a água extra e intracelular acaba por formar cristais de gelo rompendo estruturas celulares, como a membrana plasmática [44-46], gerando

lesões mitocondriais [47] e desnaturação da molécula de DNA. Dessa forma, todas essas crioinjúrias ocasionadas pelo processo de criopreservação levam a diminuição na viabilidade e capacidade de fertilização dos gametas [48].

Segundo Meer et al [49] a membrana plasmática além de ser uma barreira determinante para o intercâmbio de moléculas entre o meio intra e extracelular, responde a estímulos físicos e químicos do ambiente. A fluidez de membrana se dá pela interação e distribuição heterogênea de seus lipídeos e proteínas [49]. Segundo Hazel & Williams [50], a temperatura é um dos fatores que mais influenciam nessa fluidez, sendo que qualquer mudança nessa organização dos lipídeos e proteínas poderá perturbar a função da membrana plasmática.

A mitocôndria é a organela responsável pela produção de energia (ATP) necessária para o funcionamento e manutenção da célula. Sabe-se atualmente que as mudanças na morfologia das mitocôndrias (mudança de tamanho e morfologia) podem levar a consequências drásticas, impossibilitando seu funcionamento ideal [51-53].

O DNA é responsável pela transmissão da herança genética de todos os seres vivos e qualquer dano que o DNA possa sofrer acarreta em diversas anomalias, tanto para a célula, como para o ser vivo como um todo. Segundo Álvarez [54], é de suma importância a integridade do DNA paterno, pois seu nível de fragmentação elevado, quando não reparado pelo DNA do oócito quando fertilizado, incapacitará a formação de embriões saudáveis.

Dessa forma, a fim de minimizar os danos da criopreservação sobre as células espermáticas, é necessário a utilização de soluções de criopreservação e agentes crioprotetores [55]. As soluções de criopreservação (diluentes) precisam ter as características básicas do plasma seminal, tais como pH e osmolalidade para que não ocorra ativação dos espermatozoides e deformações na célula devido a pressão osmótica [39].

Dentre os diluentes utilizados encontram-se o *Betsville Thawing Solution* (BTS) que contem glicose, para fornecimento de energia, bicarbonato para controlar o pH, pequenas quantidades de potássio e etilenodiamino tetra-acético (EDTA) [56]. Também já foi bastante utilizado diluentes com base salina com glicose [57, 58], diluentes específicos para carpa [59], diluentes que misturam diversas substâncias, como cloreto de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, água destilada, entre outros [60].

O diluente *Mounib* que contem sacarose, para o fornecimento de energia, bicarbonato para o controle do pH e glutathione reduzida que é um tipo de antioxidante [61]. Esse diluente foi testado na criopreservação seminal de *O. bonariensis*, obtendo melhores resultados em relação ao diluente com base salina [62].

Os crioprotetores podem atuar internamente na célula, minimizando a formação de cristais de gelo na membrana plasmática [44] ou externamente, atuando na estabilização e fluidez de membrana [63, 64], desta forma devem fazer parte da composição do diluente de congelamento. A gema de ovo é um crioprotetor externo, largamente empregada para a criopreservação de sêmen por conter, dentre outros compostos, a lipoproteína de baixa densidade [46, 65].

A trealose proporciona uma maior proteção para membrana plasmática aos danos causados pela criopreservação através da interação com os fosfolipídios e proteínas, além disso, promove a desidratação celular, reduzindo o fluxo de água através da membrana celular durante o processo de congelamento [66-68].

Outro crioprotetor externo que vem sendo bastante utilizado na criopreservação seminal são os lipossomas [69, 70], sua atuação na célula ainda não é muito conhecida, mas acredita-se que sua composição lipídica consiga incorporar-se às membranas das células criopreservadas atuando na sua estabilidade [71-73].

Atualmente, um composto largamente empregado para a crioproteção intracelular no processo de preservação de gametas masculinos de várias espécies é o glicerol [74]. Entretanto, este álcool apresenta algumas desvantagens para a manutenção da integridade celular, devido ao alto peso molecular, alta viscosidade e pouca permeabilidade. Estas características alteram a polimerização da proteína tubulina, modificando a forma dos microtúbulos associados, prejudicando a integridade da membrana plasmática, comprometendo a estrutura da camada de glicocálix e o balanço energético [47]. Além disso, também ocorre estresse osmótico, devido à retirada de água intracelular [75].

Segundo Viveiros e Godinho [76], no congelamento de sêmen de peixes, o Dimetilsulfóxido – DMSO obteve melhores resultados em relação ao metanol e metilglicol, tornando-se o crioprotetor interno mais utilizado. A ação crioprotetora do DMSO se dá por alguns fatores como: a facilidade de penetração nas membranas plasmáticas, a capacidade de se ligar em hidroxilas evitando, de certa forma, a acumulação de radicais livres e, também, por ser capaz de ser oxidado [77, 78].

Outro agente crioprotetor interno que vem sendo utilizado são as amidas, sua ação crioprotetora é atribuída ao baixo peso molecular e alta permeabilidade celular, diminuindo a possibilidade de danos à membrana celular [79]. Seu grupo funcional amina associa-se ao hidrogênio da molécula de água através de uma união mais eficiente com a água, quando comparada à do glicerol, promovendo a formação de gel intracelular em vez de cristais de gelo, que são benéficos, pois minimizam as criofraturas da membrana espermática [44].

Em espécies nativas brasileiras, o efeito direto da utilização das amidas nas estruturas celulares foi avaliado somente em espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) [80]. Outras espécies de peixes como *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus scrofa*, *Silurus glanis*, *Brycon orbignyanus*, *Paralichthys orbignyanus* e *Morone saxatilis* foi avaliado o efeito de amidas sobre a membrana plasmática [81-85] ou sobre as mitocôndrias [84].

Entretanto, em células espermáticas descongeladas da espécie *Odontesthes bonariensis*, não se tem relatos até o presente momento do efeito das amidas. Logo, o presente estudo teve por objetivo analisar a utilização de amidas como crioprotetor na criopreservação seminal de Peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*).

REFERÊNCIAS

- [1] Ricklefs RE. A Economia da Natureza. 5ª ed. Cidade: Guanabara Koogan; 2009.
- [2] Lévêque C, Oberdoff T, Paugy D, Stiassny MLJ, Tedesco PA. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 2008; 595:547 – 567.
- [3] Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade* 2005; 1: 71-78.
- [4] CONAMA. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005. Publicado no DOU nº 053, de 18/03/2005, p. 58-63.
- [5] Cole JJ, Prairie IT, Caraco NF, McDowell WH, Tranvik L, Striegl RG, Duarte CM, Kortelainen P, Downing JA, Middelburg JJ, Melack J. Plumbing the Global Carbon Cycle: Integrating Inland Waters into the Terrestrial Carbon Budget. *Ecosystems* 2007; 10: 171-184.
- [6] MEA, Ecosystems and Human Well-beings: Wetlands and Water Synthesis. World Resources Institute 2005, Washington, DC.
- [7] Barros C, Paulino W. Ciências: o meio ambiente. 4ª ed. São Paulo: Ática; 2011.
- [8] Williams P, Whitfield M, Biggs J, Bray S, Fox G, Nicolet P, Sear D. Comparative biodiversity of rivers, streams, ditches and ponds in an agricultural landscape in Southern. *Engl Biol Conserv* 2003; 115: 329-341.
- [9] Abramovitz JN. Imperiled waters, impoverished future: The decline of freshwater ecosystems. *Worldwatch Paper* 128. Worldwatch Insitute, Washington, DC 1996.
- [10] Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata ZI, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Richard AHP, Soto D, Stiassny MLJ, Sullivan CA. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Revie* 2006; 8: 163-182.

- [11] Esteves FA, Fundamentos de Limnologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência Ltda; 1998.
- [12] Vieira EF, Rangel SR. Planície Costeira do Rio Grande do Sul: Geografia Física, Vegetal e Dinâmica Sócio-demográfica. 1ª ed. Porto Alegre: Porto Alegre; 1988.
- [13] Artioli LGS, Vieira JP, Garcia AM, Bemvenuti MA (2009) Distribuição, dominância e estrutura de tamanhos da assembleia de peixes da lagoa Mangueira, sul do Brasil. Iheringia, Sér Zool. 2009; 99: 409-418.
- [14] Gomes N & L Krause. Lista preliminar de répteis da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul. Rev Bras Zool 1982; 1: 71-77.
- [15] Andrade FFC, Niencheski FHL, Attisano KK, Milani RM. Fluxos de nutrientes associados às descargas de água subterrânea para a Lagoa Mangueira (Rio Grande do Sul, Brasil). Quim Nova. 2012; 35: 5-10.
- [16] Prodohl PA & Levy JÁ. Genetic study of atherinidae fishes of Mangueira lagoon (RS-Brasil). Comp Biochem Physiol. 1989; 94B: 423-426.
- [17] Piedras RN, Pouey LOF. Alimentação do peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*, Atherinopsidae) nas lagoas Mirim e mangueira, Rio Grande do Sul, Brasil. Sér Zool 2005; 2: 117-120.
- [18] Fagundes CK & Bager A. Ecologia reprodutiva de *Hydromedusa tectifera* (Testudines: Chelidae) no sul do Brasil. Biota Neotropica 2007; 7: 179-184.
- [19] Reis RE, Kullander SO & Ferraris CJ. Check List of The Freshwater Fish of South and Central America. Edipuc RS. Porto Alegre: Epecê; 2003.
- [20] Mello FT, Bergonzoni IG, Loureiro M. Peces de agua Dulce del Uruguay. 1ª ed. Uruguai: PPR-MGAP; 2000.
- [21] Harrison TD, Whitfield AK. Fishes as Indicators of Estuarine Health and Estuarine Importance. Ecological Indicators 2008; 1593-1599.
- [22] Bemvenuti MA. Osteologia comparada entre espécies de peixes – rei *Odontesthes Evermann & Kendall* (Osteichthyes, Atherinopsidae) do sistema lagunar Patos – Mirim, no extremo sul do Brasil. Rev Bras de Zool 2005; 22: 293 – 305.
- [23] Dyer BS. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). Biocell 2006; 30: 69–88.
- [24] Strüssmann CA, Calsina Cota JC, Phonlor G, Higuchi H and Takashima F. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. Environ Biol. Fishes 1996b, 47:143–154.

[25] Strussmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Takashima F. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J Exp Zool* 1997; 278: 167–177.

[26] Calvo J, Morriconi ER. Fenómenos reproductivos en el pejerrey “*Basilichthys bonariensis*”. III. Estudio de la fecundidad, época y número de desoves. *Anal. Soc. Cient. Ar* 1972; 193: 75-84.

[27] Strüssmann CA. Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Doctoral Thesis 1989, Tokyo University of Fisheries. Tokyo p351.

[28] Phonlor G & Cousin JC. Biología do Desenvolvimento de Ovos e Larvas de Aterinídeos. In: Seeliger, U.; Odebrecht, C & Castello JP (Eds). *Os Ecossistemas Costeiros e Marinho do Extremo Sul do Brasil*. Ecoscientia. Rio Grande; 1998.

[29] Moresco A & Bemvenuti MA. Biología reprodutiva do peixe-re *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes) (Atherinopsidae) da região marinha costeira do sul do Brasil. *Rev Bras Zool* 2006. 23: 1168-1174.

[30] Bemvenuti, MA. Diferenciação morfológica das espécies de peixes rei, *Odontesthes* Evermann & Kendall (Osteichthyes, Atherinopsidae) no extremo sul do Brasil: morfometria multivariada. *Rev Bras Zool* 2002; 19: 251-287.

[31] Blanco MV, Cattoni DI, Carriquiriborde P, Grigera JR, Chara O. Kinetics of bioaccumulation of heavy metals in *Odontesthes bonariensis* is explained by a single and common mechanism. *Ecological modeling* 2014; 274 :50-56.

[32] Tsuzuki MY, Ogaw K, Strüssmann CA, Maita M, Takashima F. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 2001; 200: 349-362.

[33] Carriquiriborde P., Díaz J., López GC., Ronco AE., Somoza GM (2009) Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation, and gonadal developmental stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). *Chemosphere*. 76: 374: 380.

[34] Elísio M, Chalde T, Miranda LA. Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) oogenesis in the wild. *Comp Biochem Physiol Part A* 2014; 175: 102-109.

[35] Rubinsky B. Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Failure Reviews* 2003; 8: 277–284.

[36] Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac Res* 2000; 31: 231-243.

- [37] Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JÁ, Herráez MP. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 2009; 71: 594–604.
- [38] Woelders H, Windig J, Hiemstra SJ. How Developments in Cryobiology, Reproductive Technologies and Conservation Genomics Could Shape Gene Banking Strategies for (Farm) Animals. *Reproduc Domestic Anim* 2012; 47: 264-273.
- [39] Chambeyron F and Zohar Y. Diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 1990; 90: 345-352.
- [40] Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*. 2001; 76: 891-900.
- [41] Huang C, Dong Q, Walter RB, Tiersch TR. Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Theriogenology* 2004; 62: 179-194.
- [42] Moreno D, Bencharif D, Amirat-Briand L, Neira A, Destrumelle S, Tainturier D. Preliminary Results: The Advantages of Low-Density Lipoproteins for the Cryopreservation of Equine Semen. *J Equine Vet Sci* 2013 33: 1068-1075.
- [43] Azad GK, Singh V, Mandal P, Singh P, Golla U, Baranwal S, Chauhan S, Tomar RS. Ebselen induces reactive oxygen species (ROS) mediated cytotoxicity in *Saccha-romyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. *FEBS Open Bio* 2014; 4: 77–89.
- [44] Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim R, Corcini CD, Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia T Jr, Deschamps JC, Corrêa MN. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 2008; 69: 632– 8.
- [45] Hu J, Li Q, Jiang Z, Li W. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 2008; 57: 257– 62.
- [46] Varela AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MVF, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia T, Deschamps JC. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science* 2009; 115: 323-327.
- [47] Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992; 29: 26–38.
- [48] Chao NH, Liao IC. Cryopreservation on finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 2001; 197: 161–189.

[49] Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 112–124.

[50] Hazel JR, Williams EE. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 1990; 29: 167-227.

[51] Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 1994; 27:198–219.

[52] Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 2002; 21: 1616–1627.

[53] Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 607–625.

[54] Álvarez JG. Aplicações clínicas Del estudio de fragmentación Del ADN espermático. *Rev Int Androl* 2007; 5: 354-63.

[55] Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.

[56] Johnson LA, Weitze KF, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143-172.

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

[58] Viveiros ATM, Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Caneppele D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology* 2012; 78: 361–368.

[59] Irawan H, Vuthiphandchai V, Nimrat S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Anim Reprod Sci* 2010; 122: 236-2443.

[60] Basavaraja N, Hegde SN. Cryopreservation of the endangered mahseer (Tor Khudree) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology* 2004; 49: 149-156.

[61] Butts IAE, Litvak MK, Kaspar V, Trippel EA. Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: Effect of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology. *Cryobiology* 2010; 61: 174-181.

- [62] Lichtenstein G, Elisio M, Miranda LA. Development of sperm cryopreservation techniques in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 2010; 306: 357-361
- [63] Watson PF, Morris GJ. Cold shock injury in animal cells. *Soc Exp Biol* 1987; 31: 1-337.
- [64] De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effect of various cryoprotectants agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 1993; 30: 32-44.
- [65] Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez MP. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* 2010; 74: 282-289.
- [66] Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2000; 54: 579-585.
- [67] Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002; 57: 1801-1808.
- [68] Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in RAM spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005; 50: 239-249.
- [69] Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H, Wolkers WF. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* 2011; 76: 1465–1472.
- [70] Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 2012; 77: 268–279.
- [71] Houpe MJ, Bally MB, Mayer LD, Jonoff AS and Cullis PR. Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid Vesicles. *Chem Physics Lipids* 1986; 40: 89-107
- [72] Steck TL, Kezdy FJ, Lange Y. An activation-collision mechanism for cholesterol between membranes. *J Bio Chem* 1988; 263: 13023-31.
- [73] Bruckdorfer KR, Demel RA, De Gier J, Van Deenen LLM. The effect of partial replacements of membrane cholesterol by other steroids on the osmotic fragility and glycerol permeability of other erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1969; 183: 334-45.
- [74] Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science* 2005; 89: 105–113.

- [75] Gilmore JA, Mcgann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1995 53: 985–995.
- [76] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 2009; 35: 137-150.
- [77] MacGregor WJ. The chemical and physical properties of DMSO. *Ann N Y Acad Sci* 1967; 141: 3-12.
- [78] Akyure K N, Kafali EM, Muhtaroglu, S. The effect of dimethylsulphoxide on experimental hepatic ischemia. *Swiss Surg* 2000; 6: 23-27.
- [79] Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 2001; 22: 1061–9.
- [80] Varela AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia T, Streit DP, Figueiredo MRC. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 2012; 78: 244-251.
- [81] Silveira WF, Kavamoto ET, Cestarolli MA, Godinho HM, Ramos SM, Silveira NA. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *B Inst Pesca* 1990; 17: 1–13.
- [82] Kavamoto ET, Silveira WF, Godinho HM, Romagosa E. Fertilização em *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *B Inst Pesca* 1989; 16:29–36.
- [83] Murgas LSD, Franciscatto RT, Santos AGO. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Bryconorbignyanus*, Vallenciennes, 1849). *Rev Bras Zootecn* 2003; 32: 1810–1814.
- [84] 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: 254–262.
- [85] Lanes CFC, Okamoto M, Cavalcante PV, Collares T, Campos VF, Deschamps JC, Robaldo RB, Marins LF, Sampaio LA. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture* 2008; 275: 361-36.

CAPÍTULO 1

Amidas na criopreservação seminal de Peixe-rei, *Odontesthes bonariensis*

“Manuscrito a ser submetido para revista Cryobiology”

Amidas na criopreservação seminal de Peixe-rei, *Odontesthes bonariensis*

J.P. Alves^a, C.D. Corcini^c, E.F. Silva^d, J.S. Caldas^a, T.F. Cardoso^d, F.A. Alves^a, J.C. Silva^d, S.R.N. Piedras^e, R.D. Jardim^b, A.S. Varela Junior^{b,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

^bInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

^cReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil,

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

^eDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

* Autor Correspondente: Universidade Federal de Rio Grande -9 Avenida Itália, km 8, Bairro Carreiros - Aeroporto, Rio Grande – RS. Caixa Postal 10 474, Rio Grande, Rio Grande do Sul 96203000, Brasil. Tel: (53) 32935186
E-mail: varelajras@gmail.com

RESUMO

Foram testadas amidas como crioprotetores internos, para a preservação de espermatozoides do peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*). O sêmen foi diluído em *Mounib* modificado, em seguida congelado com a adição de 2, 5, 8 e 11% de dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), metilformamida (MF), tendo como controle o dimetilsulfoxido na concentração de 10% (DMSO) diluído em *Mounib* modificado. A DMF 2% obteve maior taxa de motilidade ($17,7 \pm 1,9\%$) e tempo de motilidade ($143,2 \pm 9,7\text{seg}$) ($P < 0,05$) do que os encontrados com os demais tratamentos. Apesar da DMF 2% ter obtido melhores resultados na motilidade dos espermatozoides criopreservados de peixe-rei, ela não foi capaz de manter a integridade das estruturas celulares. O DMSO 10% e a MF 8% obtiveram melhores resultados em relação à integridade de membrana plasmática (34, 8% e 29%),

funcionalidade de mitocôndria (19,8% e 16,2%) e fluidez de membrana plasmática (39,4% e 46,4%), além disso, a taxa de motilidade (11,8% e 10%) e o tempo de motilidade (81,4seg e 71,8seg) mantiveram-se entre as melhores médias. Dessa forma, considerando os parâmetros avaliados, o DMSO10% e a MF8% foram associados à melhor criopreservação das células espermáticas de *O. bonariensis*.

Palavras chave: Crioproteção, Sêmen, Congelação, Atheriniformes

ABSTRACT

Amides as internal cryoprotectants were tested for the preservation of pejerrey of sperm (*Odontesthes bonariensis*). The semen was diluted in *Mounib* modified in the cold followed by addition of 2, 5, 8 and 11% dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF), methylformamide (MF), with the control dimethylsulfoxide at a concentration of 10% (DMSO) diluted in modified *Mounib*. 2% DMF motility had higher rate ($17.7 \pm 1.9\%$) and time motility ($143.2 \pm 9.7\text{seg}$) ($P < 0.05$) than found with the other treatments. Despite the DMF 2% have obtained better results in the motility of cryopreserved sperm kingfish, she was not able to maintain the integrity of cellular structures. The 10% DMSO and MF 8% did better on the completeness of the plasma membrane (34, 8% and 29%), functional mitochondria (19.8% and 16.2%) and plasma membrane fluidity (39.4% and 46.4%), furthermore, the motility rates (11.8% and 10%) and the motility of time (81.4s and 71.8s) remained between the top medium. Thus, considering the parameters evaluated, the DMSO10% and MF8% were associated with better cryopreservation of sperm cells of *O. bonariensis*.

Keywords: Cryoprotection, Sperm, Freezing, Atheriniformes

1. INTRODUÇÃO

O *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835), popularmente conhecido como peixe-rei, é uma espécie de água doce encontrada em Lagoas do extremo sul do Rio Grande do Sul – Brasil [4].

O peixe-rei é um exemplo de espécie nativa que vem sofrendo alterações na sua população devido à sobrepesca e à poluição de seu habitat natural [5]. Espécies nativas, são consideradas como “patrimônio cultural” do local mantendo o equilíbrio das cadeias tróficas, e também, auxiliam na reciclagem de nutrientes do ambiente [15, 26].

A fim de evitar o possível declínio das populações de peixe rei, a criopreservação seminal, tornou-se uma ferramenta valiosa desta espécie proporcionando benefícios valiosos à biologia da conservação, como a possibilidade de obtenção de gametas durante todo o ano. Estudos que buscam aperfeiçoar metodologias de criopreservação são fundamentais para o desenvolvimento de bancos de germoplasma eficientes, especialmente para espécies como o peixe rei que possui valor comercial e biológico elevado [34, 39].

Embora essa técnica venha alcançando resultados promissores em espécies como o Abalote (*Verasper variegatus*), obtendo aproximadamente 75% de motilidade espermática pós-descongelamento [33], a criopreservação pode causar estresse celular, decorrente das crioinjúrias, ocasionando diminuição na viabilidade e capacidade de fertilização do gameta [10].

Para minimizar os danos que a redução da temperatura causa nas células criopreservadas é necessário a utilização de agentes crioprotetores em soluções de resfriamento e congelamento [18], sendo que os estudos de diferentes crioprotetores e soluções de criopreservação são escassos para peixe rei.

Apesar disso, sabe-se que o dimetilsulfóxido – DMSO é um crioprotetor interno largamente utilizado entre as espécies de peixes nativos brasileiros [38], sua ação crioprotetora se dá por alguns fatores como: a facilidade de penetração nas membranas plasmáticas, a capacidade de se ligar em hidroxilas evitando, de certa forma, a acumulação de radicais livres e, também, por ser capaz de ser oxidado [1, 24]. Em peixe rei o DMSO foi testado por Lichtenstein et al., 2010[23] com resultados relevantes, apesar de terem sido avaliadas apenas a motilidade e taxa de fertilização, sem avaliação de estruturas celulares como a membrana plasmática e as mitocôndrias.

Nesse contexto, tem sido utilizado mais recentemente as amidas que são compostos orgânicos com um grupo funcional amina. Sua ação crioprotetora é atribuída ao baixo peso

molecular e alta permeabilidade celular. Seu grupo funcional associa-se ao hidrogênio da molécula de água através de uma união mais eficiente com a água, promovendo a formação de gel intracelular em vez de cristais de gelo, que são benéficos, pois minimizam as criofraturas da membrana espermática [7].

As amidas tem sido utilizadas, demonstrando ação crioprotetora satisfatória para mamíferos [7] e apesar da ampla utilização do DMSO para criopreservação seminal de peixes, o uso deste crioprotetor obteve toxicidade em Tambaqui (*Colossoma macropomum*), no qual, já obteve resultados promissores com o uso de amidas como crioprotetor [36].

Em peixes atheriniformes, inclusive da espécie *Odontesthes bonariensis*, não foi avaliado o efeito das amidas sobre as estruturas, como a membrana plasmática e as mitocôndrias espermáticas, bem como sobre a motilidade até o presente momento. Logo, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito de três tipos de amidas (dimetilformamida, dimetilacetamida e metilformamida) em diferentes concentrações (2, 5, 8 e 11%) sobre as estruturas e motilidade de espermatozoides de *O. bonariensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de sêmen

O local de coleta dos animais foi a Lagoa Mangueira –que é um dos três grandes corpos d'água doce situados no extremo sul do Rio Grande do Sul, Brasil, localizada no município de Santa Vitória do Palmar, entre as coordenadas 32°47'10'' e 33°31'30'' de latitude sul e a 52°47'10'' de longitude oeste e possui um comprimento de aproximadamente 92 Km por 7,6 Km de largura [37].

Vinte reprodutores de *O. bonariensis* foram comprados no mês de setembro de 2013 (época reprodutiva) de pescadores da região, dos vinte reprodutores, apenas onze foram utilizados. Devido aos peixes não possuírem dimorfismo sexual, a identificação de machos e fêmeas foi feita no momento da coleta do material biológico (sêmen e/ou ovos). Somente foram utilizados animais medindo no mínimo 25 cm de comprimento total e peso acima de 250g.

A fim de que não houvesse contaminação com urina ou fezes na hora da coleta e nem ativação do sêmen em contato com a água, os peixes foram primeiramente secos e o orifício

urogenital limpo [8]. Após, a coleta foi realizada através de massagem abdominal, sendo o material biológico aspirado com micropipeta e ponteiras (uma para cada macho) de 200µl.

Para a avaliação de motilidade (porcentagem de células móveis) adicionou-se 1µl de sêmen e 99µl de água destilada (25°C) em lâmina sob lamínula e analisou-se as amostras em microscópio de contraste de fases (400x), seguindo o método descrito por Sorensen (1979) [31]. Utilizou-se apenas o sêmen que apresentou mais que 80% (11 machos = 11 repetições) de motilidade após 10 segundos de ativação até a parada total dos espermatozoides móveis (segundos), os que não atingiram esses parâmetros foram descartados.

2.2. Criopreservação com diferentes crioprotetores

O sêmen foi diluído na proporção 1:50 (v/v) no diluente *Mounib* modificado segundo Lichtenstein et al. 2010 [23] composto por: 127 mM de NaHCO₃; 159 mM de sacarose; 0,025 g / ml de glutatona reduzida; pH: 8, osmolalidade 400 mOsm / kg. Após diluição em *Mounib* modificado as amostras foram divididas em 13 tratamentos nas diferentes concentrações e crioprotetores: 10% de DMSO e 2%, 5%, 8% e 11% de DMA, DMF e MF. Para cada macho, 2 repetições por tratamentos foram processados. Assim, o número total de amostras foi de 286. Todos os produtos químicos utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

Foram envasadas palhetas de 250 µl de cada tratamento. As palhetas foram previamente identificadas contendo o número do macho, tratamento e concentração. Após, foram colocadas em *racks* de metal permanecendo por dois minutos em temperatura ambiente antes de serem colocadas no *dry shipper*, permitindo um maior contato com os crioprotetores para que os mesmos penetrassem nas células espermáticas.

Passado os dois minutos, as *racks* foram colocadas no *dry shipper* permanecendo por 12 horas para a obtenção da curva de congelamento. Após as 12 horas as palhetas foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido a -196°C por oito meses.

2.3. Análises espermáticas pós-descongelamento

Descongelamento

O descongelamento ocorreu a 35°C durante 10 segundos [23] e o conteúdo de cada palheta foi depositado em microtubos contendo 200µL de *Mounib* para diluição dos crioprotetores.

Análise de Motilidade

Esta avaliação utilizou a mesma metodologia para o sêmen fresco: Adicionou-se 1µl de sêmen e 99µl de água destilada (25°C) em lâmina sob lamínula e analisou-se as amostras em microscópio de contraste de fases (400x), seguindo o método descrito por Sorensen (1979) [31].

Citometria de fluxo

As análises de integridade de membrana (IM), funcionalidade mitocondrial (FM), índice de fragmentação do DNA (IFDNA), e fluidez de membrana (FLU) foram realizadas no citômetro de fluxo Attune Acoustic Focusing ® (Life Technologies) equipado com lasers azul (488 nm) e violeta (405 nm), sendo os dados analisados através do Attune ® Cytometer software versão 2.1.0 (Life Technologies).

Para a detecção de populações espermáticas em todas as análises, as células foram coradas com Hoechst 33342 e detectadas pelo fotomultiplicador (PMT) VL1 (450/40 nm) e os eventos não-espermáticos foram eliminados com base em gráficos de dispersão [28]. A fluorescência verde do diacetato de carboxifluoresceína (integridade da membrana plasmática), rodamina 123 (funcionalidade de mitocôndrias) foi avaliada com o PMT BL1 (530/30 nm).

A fluorescência laranja da merocianina 540 (fluidez da membrana plasmática) foi detectada com PMT BL2 (575/24 nm). A fluorescência vermelha de iodeto de propídio (integridade da membrana plasmática) foi lida com o PMT BL3 (640 nm). Dez mil eventos espermáticos foram analisados por amostra a uma taxa de fluxo de 200 µL / segundo.

Integridade de Membrana

A avaliação de integridade de membrana ocorreu pela combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP), sendo que o DCF penetra os espermatozoides e é convertido intracelularmente por esterases em células viáveis em um composto fluorescente não-permeável que é retido no citoplasma, ao passo que o IP penetra apenas nos espermatozoides com membrana lesada. A solução de trabalho utilizada para a coloração dos espermatozoides continha PBS, a Hoechst 33342 (16,2 µM),

DCF (20 μM) e IP (7,3 μM). Espermatozoides foram classificados como não lesados (DCF + / IP), e lesados (DCF + / IP +; DCF- / IP +; DCF- / IP-) [14, 16].

Funcionalidade de Mitocôndria

A avaliação da funcionalidade mitocondrial foi feita através da sonda fluorescente rodamina 123 que cora mitocôndrias e concentra-se naquelas com a funcionalidade alta (alto potencial eletroquímico) emitindo fluorescência verde mais intensa. A Rodamina 123 estava presente na solução de trabalho contendo PBS, a Hoechst 33342 (16,2 μM) e rodamina 123 (13,0 μM). Os espermatozoides foram classificados como aqueles com elevada funcionalidade de mitocôndrias (fluorescência elevada, maior acúmulo de rodamina) e baixo funcionalidade de mitocôndrias (fluorescência baixa, menor acúmulo de rodamina) [16].

Índice de fragmentação de DNA

A avaliação do índice de fragmentação do DNA foi determinada pela utilização da sonda fluorescente metacromática alaranjado de acridina no ensaio de estrutura da cromatina espermática (do inglês SCSA) [12, 22].

Fluidez de membrana plasmática

A avaliação da fluidez da membrana plasmática foi determinada pela sonda fluorescente hidrofóbica, a merocianina 540 (2,7 mM) e Hoechst 33342 (16,2 μM) em PBS. As células foram classificadas quanto à alta fluorescência (alta fluidez) e baixa fluorescência (baixa fluidez) [14].

2.4. *Análise estatística*

Realizou-se estatística descritiva dos dados, sendo esses expressos como média e erro padrão da média. As diferentes avaliações espermáticas (motilidade, integridade de membrana, índice de fragmentação do DNA, fluidez de membrana,) foram consideradas independentes entre si, porém dependentes dos diferentes tratamentos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* indicando que os dados não se comportaram de forma paramétrica. Assim, realizou-se a normalização dos dados pela função *arcsen* e as médias foram analisadas quanto a sua variância (ANOVA) seguida comparação pelo teste de LSD.

3. RESULTADOS

O sêmen coletado dos machos utilizados no experimento (n=11) apresentaram taxa de motilidade de $94,5 \pm 1,6\%$ e tempo de motilidade de $147,3 \pm 10,3$ segundos.

Na análise de integridade de membrana plasmática, os tratamentos com DMSO 10%, DMA 11%, DMF 11%, e MF 11% não diferiram entre si ($P > 0,05$) e foram superiores ($P < 0,05$) a grande parte dos demais tratamentos (Tab. 1).

O DMA 11% foi o que obteve média superior em comparação às demais concentrações dessa amida (2, 5 e 8%). O tratamento contendo DMF 11% não diferiu estatisticamente dos tratamentos com DMF 8% e com DMSO 10%, porém conferiu média superior ($P < 0,05$) quando comparado às demais concentrações dessa amida (2 e 5%). O tratamento com MF 11% obteve resultado superior ($P < 0,05$) quando comparado às concentrações 2 e 5%, porém não diferiu estatisticamente do tratamento com DMSO do MF 8% (Tab. 1).

Quanto análise de índice de fragmentação do DNA todos os tratamentos com amidas (DMA, DMF e MF) em todas as concentrações (2, 5, 8 e 11%) não diferiram do tratamento com DMSO 10% ($P > 0,05$), ou seja, não ocorreu fragmentação de forma significativa (todos menores que 2,0) (Tab. 1).

Quanto à funcionalidade de mitocôndria, os tratamentos com DMSO 10%, DMA 11%, DMF 11% e MF 11% não diferiram entre si e conferiram as melhores médias. O DMA 11% e o DMF 11% foram superiores ($P < 0,05$) em comparação as concentrações 2 e 5%. O tratamento com MF 11% conferiu melhor resultado ($P < 0,05$) quando comparado ao tratamento com MF 2%. Porém, não diferiu estatisticamente em relação as demais concentrações (5 e 8%) (Tab. 1).

Em relação a fluidez de membrana plasmática, o tratamento com DMF 2% foi superior ($P < 0,05$) em comparação ao tratamento com DMA 8% e ao com DMF 8%. Porém, Não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Tab. 2).

Para a taxa de motilidade espermática, os tratamentos com DMSO 10%, DMA 2%, DMF 2% e o MF nas concentrações de 2, 5 e 8% estão entre os melhores resultados. Porém, o tratamento com DMF 2% obteve taxa de motilidade maior ($P < 0,05$) em relação a todos os tratamentos com amidas e o tratamento com DMSO 10% (Tab. 2).

Para o tempo de motilidade espermática, os tratamentos com DMSO 10%, DMA 2%, DMF em todas as concentrações (2 e 5%) e MF em todas as concentrações (2, 5, 8 e 11%) estão entre os melhores resultados. Porém, o DMF 2% obteve tempo de motilidade maior ($P < 0,05$) em relação a todos os tratamentos com amidas e o tratamento com DMSO 10% (Tab. 2).

4. DISCUSSÃO

Esse estudo é o primeiro a utilizar amidas na criopreservação seminal de *Odontesthes bonariensis* (peixe-rei). Além da motilidade avaliada por Lichtenstein et al., (2010) [23] em um experimento de criopreservação seminal com a espécie, o presente estudo inovou pela adição de avaliações espermáticas ainda não relatadas para peixe-rei, como a integridade de membrana, funcionalidade de mitocôndria, índice de fragmentação do DNA, fluidez de membrana e tempo de motilidade.

A utilização de amidas na criopreservação seminal tem sido relatada em diferentes espécies: suínos [7], garanhão [2] e canguru [25] com resultados bastante diferenciados em relação à motilidade espermática dos espermatozoides criopreservados (53,8%, 70% e 12,7%, respectivamente).

No presente estudo foi demonstrado que o tratamento contendo DMF na concentração de 2% promoveu taxa e tempo de motilidade de aproximadamente 18% e 143 segundos, respectivamente. No que se refere à motilidade pós-descongelamento com a DMF, o presente estudo obteve resultado bastante inferior (18%) em relação àqueles relatados para suínos (53,8%) e para o Tambaqui (60%) [7, 36].

Resultados de motilidade pós-descongelamento para o peixe rei foram relatados por Lichtenstein et al., (2010) [23], porém a metodologia de avaliação foi feita através de escores (de 0 a 5), tornando difícil uma comparação com os nossos resultados que ocorreram através de um método em porcentagens (de 0 a 100%).

Um fator importante que pode explicar a diferença nos resultados para motilidade entre suínos, tambaqui e peixe-rei nesses estudos utilizando amidas, é a composição do plasma seminal, pois segundo Viveiros & Godinho [38] esta composição pode interferir na

sensibilidade dos espermatozoides a ação dos crioprotetores, podendo explicar os diferentes resultados de criopreservação entre as espécies, e também, dentro da mesma espécie.

O plasma seminal do *O. bonariensis* é composto ionicamente por 4,82 mM [K], 24,7 mM de [Na], 0,2 mM [Ca] e 0,49 mM [Mg], além de ter um pH de 8 e osmolalidade de 350 mOsm/Kg [23]. Espécies como o bagre asiático (*Clarias macrocephalus*) tem sua composição iônica do plasma seminal [32] no geral, contendo mais que o dobro dos íons do plasma do peixe rei, dessa forma, a criopreservação nessas duas espécies poderá gerar resultados diferentes, especialmente no que se refere à utilização dessas soluções crioprotetoras.

O DMSO tem sido utilizado na criopreservação seminal de várias espécies de peixes em todo o mundo, como no salmão (*Oncorhynchus masou*) [17], no goraz (*Sparus aurata*) [13], no alabote (*Verasper variegatus*) [33] e na carpa (*Cyprinus carpio*) [20]. Porém, a motilidade pós-descongelamento dentre as espécies é bastante variável-, 14,5% no salmão (*O. masou*), 94,5% na carpa (*C. carpio*), e 11,8% no presente estudo com peixe rei (*O. bonariensis*), demonstrando que a eficiência do DMSO é em função da espécie.

Em peixes de água doce, a motilidade dos espermatozoides se ativa quando estes entram em contato com a água do meio onde vivem (meio hiposmótico) [27]. Segundo Billard et al [8], a motilidade vem sendo o parâmetro mais utilizado para avaliar a qualidade espermática, assim a maioria dos estudos de criopreservação seminal em peixes avalia apenas a motilidade não sendo avaliado as organelas celulares relacionadas à capacidade fertilizante.

Entretanto, considerando-se que espermatozoides inférteis já demonstraram algum tipo de motilidade [8], o comprometimento da fertilidade em nível subcelular, seja na membrana plasmática ou nas mitocôndrias, por exemplo, pode comprometer a capacidade fertilizante e isto não é demonstrado entre os parâmetros de movimentação celular do gameta masculino.

Sabe-se que cada estrutura da célula é de extrema importância para a manutenção do equilíbrio e funcionamento celular. A membrana plasmática serve de barreira seletiva com o meio intra e extracelular [35], as mitocôndrias são essenciais para a produção de energia celular [6, 30], e o DNA é responsável pela transmissão da herança genética de todos os seres vivos [3].

Considerando a motilidade espermática de peixes de água doce, de acordo com Billard [9], para que ocorra a taxa máxima de fertilização externa o tempo de motilidade espermático deve ter uma duração entre 30 a 60 segundos na natureza. No presente estudo, vários tratamentos (DMF 2%, MF 5%, MF 2%, DMSO 10%, DMF 5%, DMA 2% e MF 8%) obtiveram bons tempos (> 60 s) de motilidade espermática do sêmen descongelado do *O. bonariensis*, desta forma estes garantiriam a capacidade de fertilização dos oócitos. Os

tratamentos DMSO 10 % e MF 8 % além de manter a motilidade acima de parâmetros aceitáveis, 81,4 seg. e 71,8 seg. respectivamente, foram os tratamentos que melhor preservaram as organelas da célula espermática.

Assim como no presente estudo, em coelhos [19], as amidas não se sobressaíram em relação ao tratamento contendo DMSO, mas sim obtiveram resultados próximos na capacidade de preservação do sêmen criopreservado. Entretanto, em ovinos [29] a concentração mais baixa de MF (3%) foi a que melhor manteve os parâmetros de qualidade dos espermatozoides criopreservados, ao contrário do presente estudo que a MF mais eficaz foi a segunda mais concentrada (8%), comprovando dessa forma que a ação das amidas difere entre as espécies.

O tratamento que se sobressaiu em taxa e tempo de motilidade (DMF 2%) não obteve resultados satisfatórios para integridade de membrana plasmática (16,9%), funcionalidade de mitocôndria (11,9%) e fluidez de membrana (47,8%). Devido à inconstância dos resultados nas diferentes avaliações, seria precipitado eleger este crioprotetor para a criopreservação seminal de *O. bonariensis*, uma vez que não se sabe, em condições de inseminação artificial, qual seria a avaliação *in vitro* que teria melhor correlação com a fertilização e eclosão. Os tratamentos que apresentaram resultados mais próximos das médias de motilidade e tempo de motilidade e que obtiveram bons resultados e constância nas demais avaliações (organelas) são o DMSO 10% e a MF 8%.

O fato do DMSO 10% e da MF 8% terem obtido resultados semelhantes é curioso uma vez que o DMSO trata-se de um álcool e a metilformamida de uma amida possuindo maneiras diferenciadas de atuação como crioprotetores celulares. O DMSO, entre outros fatores, altera a estrutura e propriedade da bicamada lipídica da membrana plasmática devido a sua interação indireta (desidratação induzida) com a camada externa da membrana e a interação direta com a região interna da bicamada lipídica da membrana [21], dessa forma ele consegue penetrar mais facilmente na membrana celular. Além disso, possui a capacidade de se ligar a hidroxilas evitando, de certa forma, a acumulação de radicais livres [1, 24].

Já as amidas possui sua ação crioprotetora atribuída ao baixo peso molecular e alta permeabilidade celular, diminuindo a possibilidade de danos à membrana celular [7]. Seu grupo funcional amina associa-se ao hidrogênio da molécula de água através de uma união eficiente com a água, promovendo a formação de gel intracelular em vez de cristais de gelo, que são benéficos, pois minimizam as criofraturas da membrana espermática [7]. É possível que esta semelhança na manutenção dos padrões de qualidade das células espermáticas criopreservadas de peixe rei deva-se, também, ao efeito da interação desses crioprotetores

com as moléculas que compõem o plasma seminal, ou seja, tanto a MF 8% quanto o DMSO 10%, quando em contato com o plasma seminal, agiram na dinâmica de criopreservação de modo semelhante, apesar de estes compostos terem grupos funcionais distintos.

Em conclusão, nas mesmas condições experimentais, indicamos a utilização dos crioprotetores metil formamida a 8 % e DMSO a 10 %, devido a estes terem apresentado bons resultados e constância de resultados dentre as diferentes análises executadas nas células espermáticas criopreservadas de *O. bonariensis*.

5. REFERÊNCIAS

[1] N. Akyurek, E.M. Kafali, S. Muhtaroglu, The effect of dimethylsulphoxide on experimental hepatic ischemia, *Swiss Surg.* 6 (2000) 23-27.

[2] M.A. Alvarenga, F.O. Papa, F.C. Landim-Alvarenga, A.S.L. Medeiros. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review, *Ani Reprod Sci.* 89 (2005) 105–113.

[3] J.G. Álvarez, Aplicaciones clínicas Del estudio de fragmentación Del ADN espermático, *Ver Int Androl.* 5 (2007) 354-63.

[4] M.A. Bemvenuti, Osteologia comparada entre espécies de peixes – rei *Odontesthes Evermann*& Kendall (Osteichthyes, Atherinopsidae) do sistema lagunar Patos – Mirim, no extremo sul do Brasil, *Rev Bra Zool.* 22 (2005) 293 – 305.

[5] G.E. Berasain, D.C. Colautti, M.R. Lenicov, C.A. Velasco, Variaciones estacionales e historicas de las especies ícticas de la laguna chascomús, *Biol Acuát.* 22 (2005) 47-48.

[6] J. Bereiter-Hahn, M. Voth, Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria, *Microsc. Res. Tech.* 27 (1994) 198–219.

[7] I. Bianchi, K. Calderam, E.F. Maschio, E.M. Madeira, R. Ulguim, C.D. Corcini, Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation, *Theriogenology.* 69 (2008) 632– 8.

[8] R. Billard, J. Cosson, L.W. Crim, Broodstock management and seed quality-General considerations, in: N. Bromage & R.J. Roberts, (Eds.), *Broodstock management and egg larval quality*, Oxford: Blackwell Science, 1995, pp. 1-24.

- [9] R. Billard, Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, *Reprod. Nutr. Dévelop.* 26 (1986) 877-920.
- [10] N.H. Chao, I.C. Liao, Cryopreservation on finfish and shellfish gametes and embryos, *Aquaculture*. 197 (2001) 161–189.
- [11] T.J. Collins, M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells, *EMBO J.* 21 (2002) 1616–1627.
- [12] D.P. Evenson, L. Thompson, L. Jost, Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility, *Theriogenology*. 41 (1994) 637–51.
- [13] A. Fabbrocini, S.L. Lavadera, S. Rispoli, G. Sansone, Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa, *Cryobiology*. 40 (2000) 46-53.
- [14] R. Fernández-Gago, J.C. Domínguez, F. Martínez-Pastor, Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*. 80 (2013) 400–410.
- [15] G.C. Gandini, E. Villa Analysis of the cultural value of local livestock breeds: a methodology, *J. An. Breed an Genet.* 120 (2003) 1-11.
- [16] L. Gillan, G. Evans, W.M.C. Maxwell, Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential, *Theriogenology*. 63 (2005) 445–457.
- [17] J.C. Gwo, H. Ohta, K. Okazawa, H.C. Wu, Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*), *Theriogenology*. 51 (1998) 569-582.
- [18] W.V. Holt, Basic aspects of frozen storage of semen, *An. Reprod. Sci.* 62 (2000) 3-22.
- [19] N. Iaffaldano, M. Di Iorio, M. Rosato Pina, The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide, *Theriogenology*. 78 (2012) 1381-1389.
- [20] H. Irawan, V. Vuthiphandchai, S. Nimrat, The effect of extenders, cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Ani. Reprod. Sci.* 122 (2010) 236-243.
- [21] S. Leekumjorn, K. A. Sum, Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers. *Bioch Biophys Acta*. 1758 (2006) 1751-1758.
- [22] L. M. Lewin, R. Golan, P. Freidlin, L. Shochat, A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry, *Comp Bioch Physiol Part A* 124 (1999) 133–137.

- [23] G. Lichtenstein, M. Elisio, L. A. Miranda, Development of sperm cryopreservation techniques in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, *Aquaculture* 306 (2010) 357-361.
- [24] W. MacGregor, The chemical and physical properties of DMSO, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141 (1997) 3-12.
- [25] R. McClean, Y. P. Zee, W. V. Holt, S. D. Johnston, Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol, *Cryobiology* 57 (2008) 304-307.
- [26] F. T. Mello, I. G. Bergonzoni, M. Loureiro, *Peces de agua Dulce del Uruguay*. 1^a ed., Uruguai, 2000.
- [27] M. Morisawa, Cell signalling mechanism for sperm motility, *Zool Sci* 11 (1994) 647-662.
- [28] S. Nagy, J. Jansen, E. K. Topper, B. M. Gadella, A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles, *Biol Reprod* (2003) 1828-35.
- [29] C. Pereira das Graças, A. In Piao Gomes Lim, A. Antonini Guedes Fidelis, J. Roquete Cardoso, H. Blume, R. Gianella Mondadori, Metil-Formamida na criopreservação de sêmen ovino, *Cienc Anim Bras* 14 (2013) 481-487.
- [30] A. A. Rowland, G. K. Voeltz, Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (2012) 607–625.
- [31] A. M. Sorensen, *A laboratory for animal reproduction*, 4^a ed., Massachusetts, 1979.
- [32] J. D. Tan-Fermin, T. Miura, S. Adachi, K. Yamauchi, Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther), *Aquaculture* 171 (1999) 323-338.
- [33] Y. S. Tian, S. L. Chen, X. S. Ji, J. M. Zhain, L. J. Sun, C. Chen, P. Z. Su, Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm, *Aquaculture* 284 (2008) 268-271.
- [34] T. R. Tiersch, Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen, *Rev Bras de Zoot* 37 (2008) 15-17.
- [35] G. Van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 112–124.
- [36] A. S. Varela, C. D. Corcini, S. M. M. Gheller, R. D. Jardim, T. Lucia, D. P. Streit, M. R. C. Figueiredo, Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*, *Theriogenology* 78 (2012a) 244-251.

[37] E. F. Vieira, S. R. Rangel, Planície Costeira do Rio Grande do Sul: Geografia Física, Vegetal e Dinâmica Sócio-demográfica. 1ª Ed., Porto Alegre, 1988.

[38] A. T. M. Viveiros, H. P. Godinho, Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review, *Fish Physiol Biochem* 35 (2009) 137-150.

[39] A. T. M. Viveiros, L. H. Orfão, A. F. Nascimento, F. M. Corrêa, D. Caneppele, Effects os extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes), *Theriogenology* 78 (2012) 361–368.

ANEXOS

Tabela 1: Avaliações espermáticas pós-descongelamento de sêmen de *O. bonariensis*: Integridade de Membrana; Índice de Fragmentação do DNA e Funcionalidade de Mitocôndria em tratamentos com crioprotetores – Média e Erro Padrão da Média (n=11 ejaculados). Médias comparadas por ANOVA seguida de LSD. Letras diferentes (a-g) em cada coluna diferem estatisticamente.

Crioprotetor	(%)	Integridade Membrana (%)	Índice Fragmentação DNA	Funcionalidade Mitocôndria (%)
DMSO^x	10	34,8±1,0 ^{ab}	0,75±0,10 ^a	19,8±1,5 ^{abc}
DMA^y	2	17,3±1,7 ^{ef}	1,09±0,14 ^a	9,9±1,2 ^g
	5	23,8±3,0 ^{cd}	0,67±0,11 ^a	12,2±1,4 ^{efg}
	8	30,2±2,0 ^b	0,70±0,08 ^a	14,9±0,8 ^{def}
	11	36,3±2,2 ^{ab}	0,69±0,08 ^a	19,6±1,7 ^{abcd}
DMF^w	2	16,9±1,3 ^f	0,97±0,06 ^a	11,9±1,0 ^{fg}
	5	22,3±1,4 ^{def}	0,85±0,13 ^a	15,1±1,5 ^{cde}
	8	30,3±2,2 ^b	0,90±0,09 ^a	16,6±2,0 ^{bcdef}
	11	34,5±2,3 ^{ab}	0,84±0,12 ^a	23,7±3,0 ^a
MF^z	2	17,3±1,3 ^{ef}	0,91±0,08 ^a	13,0±0,8 ^{efg}
	5	23,0±1,9 ^{de}	1,0±0,12 ^a	16,8±1,4 ^{bcde}
	8	29,0±2,6 ^{bc}	1,18±0,24 ^a	16,2±1,7 ^{bcdef}
	11	34,9±3,2 ^{ab}	0,82±0,10 ^a	20,3±2,6 ^{ab}

^xDimetilsulfóxido; ^yDimetilacetamida; ^wDimetilformamida; ^zMetilformamida.

Tabela 2: Avaliações espermáticas pós-descongelamento de sêmen de *O. bonariensis*: Fluidez Membrana, Taxa de Motilidade e Tempo de Motilidade – Média e Erro Padrão da Média (n=11 ejaculados). Médias comparadas por ANOVA seguida de LSD. Letras diferentes (a-f) em cada coluna diferem estatisticamente.

Crioprotetor	(%)	Fluidez Membrana (%)	Taxa Motilidade (%)	Tempo Motilidade(s)
DMSO^x	10	39,4±4,3 ^{abc}	11,8±1,5 ^b	81,4±10,2 ^{bcd}
DMA^y	2	46,1±3,7 ^{ab}	10,9±1,9 ^{bc}	72,6±10,9 ^{bcdef}
	5	39,6±3,2 ^{abc}	5,9±1,7 ^{cde}	38,0±10,0 ^{ef}
	8	35,4±3,4 ^{bc}	3,6±1,1 ^e	34,4±10,0 ^f
	11	37,9±3,8 ^{abc}	4,1±1,9 ^e	39,0±15,2 ^{ef}
DMF^w	2	47,8±4,6 ^a	17,7±1,9 ^a	143,2±9,7 ^a
	5	43,1±4,7 ^{abc}	8,2±1,6 ^{bcde}	74,8±14,1 ^{bcde}
	8	33,1±2,9 ^c	5,4±1,4 ^{de}	49,2±11,9 ^{cdef}
	11	41,1±4,1 ^{abc}	3,6±1,0 ^e	43,2±12,8 ^{def}
MF^z	2	45,8±4,1 ^{ab}	10,5±2,5 ^{bcd}	84,1±16,2 ^{bc}
	5	43,6±5,2 ^{abc}	11,8±2,7 ^b	94,4±21,8 ^b
	8	46,4±4,6 ^{ab}	10,0±2,3 ^{bcd}	71,8±16,2 ^{bcdef}
	11	45,0±4,7 ^{ab}	5,5±1,6 ^{de}	54,2±17,6 ^{cdef}

^xDimetilsulfóxido; ^yDimetilacetamida; ^wDimetilformamida; ^zMetilformamida.