



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



**Glutathione Reduzida e Adenosina trifosfato
(ATP) na Criopreservação seminal de Tambaqui,
*Colossoma macropomum***

Fernanda Alves Pereira

Orientador: Antonio Sergio Varela Junior

Rio Grande
2015



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



Glutathione Reduzida e Adenosina trifosfato (ATP) na Criopreservação seminal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*

Aluno: Fernanda Alves Pereira

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Carine Dahl Corcini

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
2015

*Dedico este trabalho à Elora, que esteve comigo em todos os momentos
e me fez acreditar que era possível, obrigada pela confiança .*

“É pra quem tem fé...”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me iluminado nessa caminhada.

A minha mãe e pai Sandra e minha irmã Paula que sempre estiveram ao lado me incentivaram a crescer, ir atrás dos meus sonhos, obrigada por tudo! Todos os momentos difíceis foram superados, o amor e carinho de vocês foram essenciais para esta conquista. Este título também é vocês!

A minha segunda mãe Cecília, ao tio Alexandre, a tia Lia e a Vó Eva que sempre estiveram ao lado dando apoio e carinho.

A meu orientador Prof. Dr. Antonio Sergio, obrigada pela confiança, incentivo, e pelo conhecimento, cada dia que convivo contigo é um aprendizado, não apenas na pesquisa, mas na vida! Muito obrigada pelas oportunidades únicas que me fizeram crescer como profissional e pessoa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brasília , DF, Brasil) pela bolsa de pós graduação atribuída e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento deste trabalho científico (Fapergs nº 15247.317.15427.22052014).

Ao pesquisador da Embrapa Alexandre Maria, pela paciência e pelos ensinamentos durante o período que fiquei em Aracaju.

Ao pessoal do Labra, Claydson, Adriano, Samara, Danilo, que ajudaram nos experimentos em Aracaju, obrigada pela acolhida.

A Prof. Dra Carine Corcini pelo incentivo, apoio, confiança e compressão pelo trabalhos em finais de semana.

Aos colegas do grupo REPROPEL, especialmente a Alessandra e Diego, que foram essenciais para finalização do meu trabalho, obrigada por trabalharem até tarde comigo, e Alessandra muito obrigado por me acolher na tua casa durante os experimentos sem isso o trabalho teria sido muito mais difícil.

A Jéssica, que foi minha amiga e companheira nas idas e vindas de Pelotas e nas disciplinas. Obrigada pelo apoio, amizade, e companheirismo.

Aos colegas do RAC pelo incentivo. Muito obrigada!

RESUMO

O *Colossoma macropomum*, tem importância ecológica nos ecossistemas amazônicos, pois auxilia na propagação de sementes a longas distâncias. No entanto, o aumento da ação antrópica pelo desmatamento da mata ciliar, construção de barragens e hidrelétricas diminuem a diversidade genética e prejudicam sua reprodução. O aumento da degradação nos ambientes naturais, decorrentes da invasão agrícola, expansão urbana e poluição, tem como consequência a perda da biodiversidade. A criopreservação é uma ótima ferramenta para criação de bancos de germoplasma, pois recupera e preserva espécies ameaçadas de extinção através da conservação de biodiversidade. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito de glutathione reduzida (GR) e adenosina trifosfato (ATP) em espermatozoides criopreservados de tambaqui, *C. macropomum* com intuito de promover protocolo específico para espécie e garantir gametas de boa qualidade para formação de um banco de germoplasma. As amostras de sêmen foram congeladas nas concentrações de 2, 4 e 6 mM de GR e 7,5; 15 e 30 mM ATP. Os tratamentos foram adicionados ao diluente BTS com DMSO 10% (controle). As amostras descongeladas foram avaliadas quanto a parâmetros de cinética pela *Computer Assisted Sêmen Analysis* (CASA) e parâmetros de funcionalidade celular por citometria de fluxo. As concentrações GR 2 e 4 mM foram superiores ao controle para o período de motilidade, motilidade total e progressiva e integridade de membrana citoplasmática. Todas as concentrações de GR e ATP tiveram redução gradativa na produção de espécies reativas de oxigênio, sendo que o ATP 15; 22,5 mM e 30 mM, diminuíram 50% ou mais, quando comparado ao controle. Todas as concentrações de GR e ATP não alteraram ($P > 0,05$) a fragmentação de DNA e a peroxidação lipídica. A fluidez de membrana do GR nas concentrações 4 e 6 mM foram melhores que o controle; e as concentrações de 2 e 4 mM mantiveram com mais eficiência o período de motilidade, motilidade total e progressiva. Dessa forma, indicamos a utilização do diluente BTS com 10% de DMSO adicionado de 4 mM de GR em espermatozoides descongelados de *C. macropomum*.

Palavras-chave: conservação, germoplasma, antioxidante, ROS.

ABSTRACT

The *Colossoma macropomum*, has ecological importance in the Amazonian ecosystems, it helps in spreading seeds over long distances. However, increased human activities deforestation of riparian vegetation, construction of dams and hydroelectric decrease the genetic diversity and harm reproduction. Increased degradation in natural environments, resulting from agricultural encroachment, pollution and urban expansion, results in the loss of biodiversity. Cryopreservation is a great tool for creating germplasm banks, for recovering and preserving endangered species through biodiversity conservation. The aim of this study was to analyze the effect of reduced glutathione (GR) and adenosine triphosphate (ATP) in cryopreserved sperm of tambaqui, *C. macropomum* aiming to promote specific protocol for species and ensure good quality gametes for germoplasma bank. Samples of semen were frozen with 2, 4, 6 mM GR and 7.5, 15, 30 mM ATP. The treatments were added to the BTS diluent with 10% DMSO (control). Thawed samples were evaluated as the kinetic parameters for *Computer Assisted Sêmen Analysis* (CASA) and cell feature parameters by flow cytometry. GR concentrations of 2 mM and 4 were higher than the control for motility period, total and progressive motility, cell membrane fluidity and integrity. All concentrations of GR and ATP were gradually reduce the production of reactive oxygen species, mainly ATP 15; 22.5 mM and 30 mM, which decreased by 50% or more when compared to the control. All concentrations of GR and ATP isolated did not change ($P > 0.05$) DNA fragmentation and lipid peroxidation. The GR membrane fluidity at concentrations of 4 mM and 6 were better than the control and the concentrations of 2 and 4 mM maintained more efficiently to motility period, total and progressive motility. Thus, indicate the use of BTS diluent with 10% DMSO added 4 mM GR thawed sperm *C. macropomum*.

Key-words: conservation, germoplasm, antioxidant, ROS.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
INTRODUÇÃO GERAL.....	9
A espécie <i>Colossoma macropomum</i>	9
Biologia Reprodutiva de Tambaqui	10
Bancos de Germoplasma	10
Criopreservação seminal.....	12
Soluções diluidoras de criopreservação	13
Crioprotetores.....	13
Criopreservação e espécies reativas de oxigênio	15
Glutathiona reduzida e adenosina trifosfato (ATP).....	15
Referências.....	17
CAPÍTULO 1.....	26
Glutathiona Reduzida e Adenosina trifosfato (ATP) na criopreservação seminal de Tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	26
Resumo	27
1. Introdução.....	28
2.0 Metodologia.....	30
2.1 Coleta espermática	30
2.2 Avaliação inicial.....	31
2.3 Criopreservação	31
2.4 Descongelamento	31
2.5 Análise de cinética espermática	32
2.6 Citometria de Fluxo	32
Integridade de membrana e Rompimento celular	33
Fluidez de Membrana	33
Funcionalidade de Mitocôndria	33
Índice de fragmentação de DNA	34
Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	34
Peroxidação lipídica (LPO)	34
2.7 Análise estatística	34
3.0 Resultados.....	35
4.0 Discussão	36
5.0 Agradecimentos.....	38
6.0 Referências bibliográficas.....	38
ANEXOS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises de cinética de espermatozoides descongelados *C. macropomum* com GR e ATP (mM). Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

Tabela 2: Análises de citometria de fluxo: fluidez de membrana citoplasmática (FM), integridade de membrana citoplasmática (IM), integridade celular (IC), espécies reativas de oxigênio (ROS), fragmentação de DNA (DNA), peroxidação lipídica (LPO), potencial de membrana mitocondrial (PMit) de espermatozoides descongelados com GR e ATP (mM). Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Colossoma macropomum*

O *Colossoma macropomum*, popularmente conhecido como tambaqui, pertencente à Família Characidae, tem como seus principais habitats águas abertas da Bacia Amazônia, Orinoco e afluentes, além de águas lânticas de áreas alagadas das florestas de várzea (Soares et al 2008). A espécie é nativa da Amazônia, dulcícola e reofílica, ou seja, realiza migração reprodutiva durante a estação de cheias. Durante esse processo, os indivíduos recebem estímulos ambientais, como por exemplo, variação na temperatura e fotoperíodo, para que ocorram mudanças em seus níveis hormonais. Através disso, uma série de eventos fisiológicos são induzidos, tal como, a proliferação das oogônias, vitelogênese, maturação dos oócitos, e desova (Acuña et al 2009), tendo em vista que a espécie é ovípara, com fecundação e desenvolvimento externos.

Durante a época de cheias na região amazônica, ocorre um transbordamento nos leitos dos rios que invadem as florestas de várzea, possibilitando abrigo e alimento a muitos animais (Claro Jr et al 2004). Ao mesmo tempo, ocorre a época de frutificação das árvores, as quais dependem das cheias cíclicas para dispersão de suas sementes, e o tambaqui espécie frugívora, que se alimenta de frutos e sementes, auxilia nesse processo propagando-as a longas distâncias (Anderson et al 2011). Além disso, acredita-se que os locais de desova do tambaqui sejam canais dos rios que abastecem as várzeas (Muniz et al 2006). Dessa forma, existe uma relação ecológica estreita entre *C. macropomum* e as angiospermas presentes nessa região, uma vez que ambas tem influência direta no ciclo reprodutivo da outra.

Por outro lado, dados do Ministério da Pesca e Aquicultura no Brasil mostram que o país possui alta produção de pescado com cerca de 1,25 milhões de toneladas/ano, e tem o *C. macropomum* como espécie mais produzida comercialmente nas regiões Norte e Nordeste. Em decorrência dessa alta exploração, existe uma preocupação com a perda da diversidade genética da espécie (Resende et al 2009) pela constante ação antrópica, tais como derrubada da mata nas regiões de várzeas (Claro Jr et al 2004) e construção de barragens e hidrelétricas, reduzindo drasticamente seu tamanho populacional (Isaac et al 1996).

Desse modo, a utilização de biotecnologias como criopreservação seminal mostra-se uma ótima ferramenta para conservação ecológica do tambaqui.

Biologia Reprodutiva de Tambaqui

A maioria dos peixes teleósteos apresenta fecundação e desenvolvimento externo. Os espermatozoides são imóveis no plasma seminal dos machos devido ao pH, concentração de íons potássio, e principalmente, pelo alto valor de osmolaridade. No momento em que os gametas são liberados na água (solução hipotônica) ocorre ativação dos espermatozoides pela redução da concentração dos íons potássio, a movimentação dos gametas ocorre em pequenos períodos de tempo, entre 60 a 120 segundos, dependendo da espécie. Por outro lado, os gametas femininos quando liberado na água, são hidratados, permitindo a abertura de um orifício por pequenos períodos de tempo, no qual o espermatozoide irá penetrar no oócito, denominado micrópila.

Por esta razão, a motilidade é o parâmetro mais utilizado para avaliação da qualidade dos gametas masculinos, pois garante o sucesso reprodutivo pela fertilização do oócito. Durante do desenvolvimento gonadal as células de Sertoli apresentam diferentes características como forma e tamanho do núcleo. Nakaghi et al (2003) analisaram a composição das células espermáticas de *C. macropomum* e observaram que os testículos apresentam espermatogônias primária e secundária, espermátocitos I e II, espermátides e espermatozoides. Além disso, durante início do período de maturação dos gametas, foram observadas células intersticiais, ou células de Leydig foram localizadas próximas a vasos sanguíneos, corroborando sua função de produção de hormônio testosterona quando estimulados pelo Hormônio Luteinizante.

Bancos de Germoplasma

O aumento da degradação nos ambientes naturais, decorrentes da invasão agrícola, expansão urbana e poluição, tem como consequência a perda da biodiversidade, como ilustra a lista de espécies ameaçadas do ICMBio. Dentre as espécies listadas, o Tambaqui não está inserido no inventário de peixes ameaçados, entretanto, o aumento da captura das dos animais selvagens vem reduzindo seu estoque natural (Batista e Petrere Jr 2003, Isaac e Ruffino 2003).

Além da pressão sobre as populações, o tamanho dos peixes é afetado, e por isso, o Ministério do Meio Ambiente classificou o *C. macropomum* como espécie sobreexploradas ou ameaçados pela sobre-exploração pela Lei nº 5 de 21 de maio de 2004. A fim de preservar, manter e aumentar a biodiversidade dos ambientes, estratégias de conservação (*in situ*) tem sido realizadas, mas nem sempre são eficazes (Leon-Quinto et al 2009). Dessa forma, aliar a preservação *in situ* e *ex situ* garante a recuperação da flora e fauna.

Os bancos de germoplasma são um exemplo de conservação *ex situ*, os quais armazenam recursos genéticos e os mantêm disponíveis para realização de procedimentos reprodutivos em laboratório. A disponibilidade dos recursos genéticos, como espermatozoides e oócitos, permite a recuperação de espécies ameaçadas, evita a perda de diversidade genética, e garante a reintrodução no ambiente natural (Barbieri et al 2003). Nesse sentido, foram criados bancos de germoplasma para espécies ameaçadas de extinção e selvagens como bisão (*Bison bonasus*) (Sipko et al 1997), tigres (*Panthera tigris*) (Willdt 1992), gazelas (*Gazela dama mho*) (Crosier et al 2006), e guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Barboso et al 2004).

Além disso, existe uma preocupação em relação ao aumento da produção pesqueira mundial pela sobrepesca, que tem como consequência a redução drástica de populações de peixes. Dessa forma, a conservação da diversidade genética por meio de bancos de germoplasma, especificamente de espermatozoides, tem sido utilizada em diversos países do mundo como por exemplo, China (carpas chinesas), Índia (carpas indianas), Malásia (peixes indígenas), Noruega (salmão do Atlântico), Filipinas (tilápia), Rússia (esturjão) e EUA (peixes do Rio Colorado).

Atualmente, o armazenamento de germoplasma promove benefícios econômicos por fornecer gametas de boa qualidade para reprodução assistida em programas de melhoramento animal. Geralmente, as espécies criadas em cativeiro, após sucessivos cruzamentos, aumentam os níveis de endogamia reduzindo a variabilidade genética. Como consequência, ocorre perda da produção por redução de peso e aumento de doenças, que podem ser letais a comunidade. Com o intuito de minimizar o cruzamento com indivíduos aparentados, os produtores podem ter a disposição estoques de germoplasma de populações selvagens, aumentando a variabilidade genética dos reprodutores. Dessa forma, é necessário conhecer a biologia reprodutiva das espécies, além do desenvolvimento de protocolos de

congelamento específicos com o propósito de obter gametas de boa qualidade para reprodução artificial, evitando a perda da biodiversidade.

Criopreservação seminal

A criopreservação preserva células, tecidos ou embriões por meio de congelamento em nitrogênio líquido a -196°C por tempo indeterminado (Pegg 2007). As baixas temperaturas retardam o tempo de vida e a morte celular pela redução do metabolismo celular que é modificando para um estado quiescente. O congelamento de sêmen é uma técnica vantajosa, pois facilita reprodução artificial, elimina a assincronia gonadal entre machos e fêmeas, aumenta produção larval, e permite a construção de bancos de germoplasma, eliminando problemas como perda de diversidade genética proporcionando a recuperação de espécies ameaçadas de extinção na natureza.

Nos últimos anos, diversos estudos tem obtido sucesso na otimização de protocolos de congelamento específicos para diferentes raças de bovinos (Gadea et al 2008), ovinos (Bucak et al 2008), e espécies de peixes (Varela Junior et al 2012). Entretanto, a biotécnica de criopreservação acarreta danos às células, chamados crioinjúrias, por serem expostas a temperaturas baixíssimas. Em decorrência disso, ocorre a formação de cristais de gelo intra e extracelular, que são tensões decorrentes das interações água-soluto, e geram lesões mecânicas irreversíveis nas organelas como mitocôndria e membrana plasmática (Cabrita et al 2005). Além disso, a alteração da temperatura fisiológica para as temperaturas abaixo do ponto de congelamento modifica a configuração da membrana plasmática e de suas proteínas afetando as trocas iônicas (Holt 2000).

Os danos ocasionados pelo congelamento também podem ocorrer no processo inverso, no descongelamento, devido ao influxo de água na célula (rehidratação) (Mazur et al 1984). Além disto, o procedimento deve ser rápido, com intuito de evitar o reagrupamento de cristais de gelo (Mazur et al 1984). O choque térmico que as células são submetidas (Wang et al 1997) promove aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Em virtude disso, a presença de ligações duplas nos ácidos graxos poliinsaturados torna a membrana plasmática suscetível ao ataque de EROS, que modificam a estrutura química, afetam a permeabilidade seletiva, gerando a peroxidação lipídica (Bansal e Bilaspuri 2011).

Soluções diluidoras de criopreservação

As soluções de criopreservação, também chamadas de diluentes, são utilizadas a fim de prevenir os possíveis danos às células espermáticas pelo congelamento e descongelamento. A função dos diluentes é fornecer características ótimas com meio nutricional ideal, pH, osmolaridade e concentração de íons; com intuito de evitar a ativação dos espermatozoides, que geralmente, estão inativos no trato seminal (Alavi e Cosson 2006).

Diversas substâncias diluidoras foram testadas em peixes, como por exemplo, soluções contendo *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (Fuhong et al 2011), glicose (Ciereszko et al 2014), *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Cabrita et al 2009), e *Mounib* (Lichtenstein et al 2010). Além desses, o *Beltsville Thawing Solution* (BTS), comumente aplicado para conservação de sêmen suíno, tem sido amplamente utilizado e apresentado resultados promissores em varias espécies de peixes de água doce (Varela Junior 2012). A composição básica desse diluente é bicarbonato, para manutenção do pH, glicose para fornecimento de energia, baixa quantidade de potássio, e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que tem função de aprisionar íons como o Ca^{+2} (Johnson et al 2002).

Crioprotetores

Os crioprotetores são compostos químicos que minimizam as injúrias causadas nas células espermáticas pela criopreservação. A combinação desses agentes com os diluentes melhoram a qualidade do sêmen descongelado proporcionando a manutenção da motilidade, integridade espermática e fertilização quando comparado ao sêmen fresco. Dentre as substâncias mais utilizadas estão os alcoóis, óxidos, proteínas e carboidratos, que são classificados em dois grupos: crioprotetores penetrantes e crioprotetores não penetrantes.

Os crioprotetores penetrantes devem ter baixo peso molecular e alta solubilidade em água, o que torna possível sua penetração nas células, protegendo as organelas, especialmente a membrana plasmática (Cabrita et al 2009). O DMSO é o crioprotetor mais utilizado na ação protetora das células espermáticas para peixes

brasileiros (Varela Junior et al 2012). Segundo o estudo realizado por Viveiros et al (2009), com sêmen de dourado, o DMSO 10% apresentou maior taxa de motilidade que o 10% glicerol, com diluente a base de glicose. O uso desse crioprotetor em curimba, *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al 2009), tiete tetra, *Brycon insignis* (Viveiros et al 2011), e pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Nascimento et al 2010) também mostraram resultados satisfatórios na crioproteção dos espermatozoides.

Para o tambaqui, já foram utilizados com sucesso Dimetil formoamida (DMF) (Varela Junior 2012) e metil glicol (Carneiro et al 2012). Menezes et al (2008), usando DMSO na concentração 10%, obteve taxa de motilidade do sêmen pós descongelado entre 5 a 10%, entretanto, não foi avaliada a influência do crioprotetor nas estruturas celulares (membrana plasmática, mitocôndria e DNA). Já no trabalho realizado por Varela Junior et al (2012), foram avaliadas a integridade de membrana, a funcionalidade de mitocôndria e integridade de DNA das células descongeladas. Sendo sugerido pelos autores que o DMSO reduziu a formação de cristais de gelo, promovendo proteção aos espermatozoides e alta taxa de fertilização (60%). Mesmo com resultados efetivos na proteção das organelas celulares, o estudo não avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio, fluidez de membrana e peroxidação lipídica das células pós congelamento.

Os crioprotetores não penetrantes possuem alto peso molecular, e por esta razão, não penetram a célula e protegem-na externamente. A suplementação dos diluentes com a gema de ovo e lipoproteína de baixa densidade (LDL) como crioprotetor externo tem sido amplamente utilizada em bovinos (Moussa et al 2012), e mais recentemente, obteve resultados promissores no congelamento de sêmen de cães (Varela Junior 2009) e peixes (Carneiro et al 2012). O LDL é extraído da gema de ovo, formando uma película protetora entre as células e a água durante o processo de congelamento e descongelamento (Anton et al 2003). Além disso, é responsável por agregar fosfolipídios e colesterol as membranas espermáticas restabelecendo seu funcionamento pós congelamento (Hua et al 2011).

Outro exemplo de crioprotetores não penetrantes são os açúcares: sacarose, rafinose, trealose e lactose, que tem como característica tornar o meio celular hipertônico promovendo a desidratação celular antes do congelamento (Aisen et al 2002). Na criopreservação dos espermatozoides de ovinos, a suplementação do diluente com rafinose promoveu maior taxa de motilidade (Tuncer et al 2012), e a trealose conferiu maior proteção às membranas plasmáticas (Bucak et al 2007). Em

peixes, glicose tem sido utilizada como crioprotetor penetrante (Dziewulska et al 2011), e apresenta efeito benéfico para salmonídeos (Sarvi et al 2006).

Criopreservação e espécies reativas de oxigênio

Em condições biológicas normais, o organismo que é aeróbico, constantemente produz as espécies reativas de oxigênio (EROS), e estão diretamente envolvidos em funções do metabolismo como produzir energia na cadeia transportadora de elétrons e eliminar agentes agressores pela fagocitose. Apesar disso, a alta produção de EROS causa o Estresse oxidativo, provocando lesões e danos irreversíveis as células e tecidos (Agarwal et al 2005).

A técnica de criopreservação submete os espermatozoides a baixas temperaturas (-196°C) para que as células sejam preservadas. O metabolismo dos espermatozoides é desacelerado, onde permanece ativo e reduzido, contudo, o choque térmico e a exposição ao oxigênio atmosférico torna as células suscetíveis a formação de EROS (Karajiet al 2014). O estresse oxidativo decorrente da produção aumentada de EROS suprime o sistema antioxidante, que tem menor concentração devido a seu citoplasma reduzido (Poulos et al 1973), ocasionando em prejuízos à célula espermática como a peroxidação lipídica (Bansal e Bilaspuri 2011).

As membranas celulares são compostas por longas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados e possuem átomos de hidrogênios altamente reativos em sua estrutura (Bansal e Bilaspuri 2011). Em decorrência dessa configuração, apresentam forte tendência de ligar-se a EROS (Agarwal et al 2005), prejudicando a fluidez de membrana e fertilização (Aitken 1995). Outro prejuízo às células espermáticas são alterações em sua morfologia como perda da motilidade, viabilidade (Baumber et al 2000), integridade da mitocôndria (Bansal e Bilaspuri 2011) e DNA (Stradaioli et al 2007).

Glutaciona reduzida e adenosina trifosfato (ATP)

O declínio das defesas antioxidantes foi corroborado por diversos estudos com sêmen de mamíferos (Bilodeau et al 2000, Gadea et al 2004). O conteúdo total de Glutaciona reduzida das células foi determinado após congelamento e

apresentaram significativa redução com 58% e 80% para bovinos (Bilodeau et al 2000), 32% para suínos (Gadea et al 2004) e 64% em humanos (Gadea et al 2011). Por esta razão, protocolos de criopreservação têm adicionado antioxidantes exógenos aos meios de congelamento (Gadea et al 2011) com intuito de minimizar a produção de EROS e obter maior proteção contra possíveis danos decorrentes dessa técnica. Diversos antioxidantes como glutathiona reduzida (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase, vitamina E, SOD mimética (MnTE) já foram adicionados nos diluentes, e promoveram efeito protetor à espermatozoides descongelados (Perumal et al 2011). Em peixes de água salgada, a adição de antioxidantes no congelamento de sêmen promoveu taxas elevadas de motilidade (Martínez-Páramo et al 2012).

Em seabass, Martínez-Páramo (2012), adicionou ao diluente vitaminas E (α -tocoferol), ácido ascórbico, e enxofre contendo aminoácidos taurina e hipotaurina, onde obtiveram maiores taxas de motilidade e menor fragmentação de DNA. Cabrita et al (Cabrita et al 2011) utilizando os mesmos aminoácidos encontrou baixa fragmentação de DNA no sêmen congelado de gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Além disso, estudos com yellow perch (*Perca flavescens*) (Lee e Dabrowsky 2004) e Artic char (*Salvelinus alpinus*) (Mansour et al 2006) relataram um aumento nas defesas antioxidantes após incluir antioxidantes na dieta dos animais. Entretanto, a adição de antioxidantes nas soluções de criopreservação de espermatozoides de peixes nativos brasileiros ainda não foi testada.

A maioria dos peixes teleósteos tem fecundação externa, e liberam seus gametas na água até a fertilização. Os espermatozoides são imóveis no testículo e tornam-se móveis quando liberados ao meio externo. Dessa forma, a motilidade espermática é crucial para garantir o sucesso reprodutivo, e depende de aspectos intracelulares como produção de ATP e estrutura flagelar (Cabrita et al 2010). O conteúdo de ATP é fonte principal para gerar o movimento flagelar e garantir a fertilização do oócito, mas o congelamento reduz o conteúdo de ATP endógeno, motilidade e velocidade (Aramli et al 2013, Cabrita et al 2005, He e Woods et al 2004). Diversos estudos utilizando ATP extracelular em espermatozoides de mamíferos aumentou as taxas de fertilização artificial. Em peixes, até o presente momento, não encontramos trabalhos com esta substância.

Em síntese, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da glutathiona reduzida (GR) e adenosina trifosfato (ATP), em diferentes concentrações, isolado ou

combinado, sobre espermatozoides congelados/descongelados de *C. macropomum*, a fim de obter protocolo específico com gametas de boa qualidade para formação de bancos de germoplasma.

Referências

Acuña JJA, Rangel JLH. Effects of Hypophysial Extract of Common Carp and the Analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*). Rev Cien CienVetUnivdel Zulia 2009;5: 486 – 494

Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. Journal of Andrology 2005; 26: 6.

Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram sêmen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology 2002; 57: 1801-1808.

Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development 1995; 7: 659-68.

Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International 2006; 30: 1-14.

Anderson JT, Nuttle T, Rojas JSS, Pendergast TH, Flecker AS. Extremely long-distance seed dispersal by an overfished Amazonian frugívora. Procce Royal Soci B 2011; 278: 3329–3335.

Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumal V, David-Briand E, Rabesona H. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. Food Chem 2003; 83: 175–183.

Aramli MS, Kalbassi MR, Nazarib RM, Aramlil S. Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. Animal Reproduction Science 2013; 143: 112– 117.

Bansal AM, Bilaspuri GS. Review Article, Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Sêmen Functions .Vet Medic Inter 2011; 1-7.

Barboso AS, Silva LR, Barros VM, Oliveira AS, Alvez MSs, Varela ES, Hassimoto DT, Alvez AL. Implantação do banco de DNA de peixes da bacia Araguaia-Tocantins: Aplicações na taxonomia, produção e conservação de recursos genéticos. Revista Integralização Universitária-RIU. Faculdade católica de Tocantins. Palmas 2004; 7: 180-181.

Barbieri G, Salles FA, Cestarolli MA. Influência de fatores abióticos na reprodução de do dourado, *S. maxillosus* e do Curimatá, *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). Acta Limno Bras 2003; 12: 85-91.

Batista VS e Petrere-Jr M. Caracterização da produção de peixe comercial desembarcou em Manaus, estado do Amazonas, Brasil. Acta Amazônia 2003; 33: 53-66.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J. Androl 2000; 6: 895–902.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev 2000; 55: 282–8.

Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A, Tekin N, Akcay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram sêmen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. Theriogenology 2007; 67: 1060–1067.

Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram sêmen after the freeze–thawing process. *Small Rum Resea* 2008; 75: 128–134.

Cabrita E, Robles V, Cuñado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology* 2005; 50: 273–284.

Cabrita E, Engrola S, Conceição S, Lacuisse M, Pousão-Ferreira P, Dinis MT. Preliminary attempts on the cryopreservation of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) sperm. *Aquaculture* 2009; 287: 152–157.

Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives *J. Appl. Ichthyol* 2010; 26: 623–635.

Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 2011. The influence of certain amino acids and vitamins in post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 189–195.

Carneiro PCF, Hymerson CA, Santos JP, Maria AN. Cryopreservation of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) sêmen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters* 2012; 33: 385-393.

Chao NH, Liao IC. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 2001; 197: 161-189.

Cierieszko A, G.J. Dietrich ,J.Nynca ,S.Dobosz, T. Zalewski. Cryopreservation of rainbow trout sêmen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture* 2014; 420–421 : 275–281.

Claro Jr, Ferreira E, Zuanon J, Araujo-Lima C. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. *Acta amaz* 2004; 34: 133 – 137.

Crosier E, Pukazhenthil B, Henghali JN, Howard JG, Dickman A L. marcador, DE Wildt Criopreservação de espermatozoides de chitas selvagens-nascido da Namíbia (*Acinonyx jubatus*) e influência do glicerol em cryosurvival. *Cryobiology* 2006; 52:169-181.

Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata Z, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Prieur-Richard A, Soto D, Stiassny MLJ, Sullivan CA. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 2006; 81: 163–182.

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

Fuhong D, Santos PL, Li J, Lei J, Rommens M, Milley JE. Cryopreservation of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus.*) for commercial application. *Cryobiology* 2011; 63: 56–60.

Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 2004; 62: 690–701.

Gadea J, Gumbao D, Cánovas S, García-Vázquez FA, Grullón LA, Gardón JC. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology* 2008; 3: 40–49

Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the

addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011; 62: 40–46.

He SY, Woods LC. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 2004; 48: 254–262.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of sêmen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62 : 3–22.

Hua JH, Jianga ZL, Lva RK, Lia QW , Zhangc SS, Zana LS, Lia YK, X Lia. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull sêmen. *Cryobiology* 2011; 66: 83-87.

Isaac VJ, Ruffino ML. Population dynamics of Tambaqui, *Colossoma macropomum Cuvier*, in the Lower Amazon, Brazil. *Fishes Manag Ecol* 1996; 3: 315 –333.

Isaac VJ e Ruffino ML. Informe Estatístico do Pesqueiro Desembarque Na cidade de Santarém, PA: 1992-1993. In: Fischer CF (Ed), *pesqueiros Recursos do Amazonas Médio: Biologia e Estatística pesqueira IBAMA / GTZ / GOPA, Brasília*. 2003; 225-280.

Johnson LA. Storage of boar sêmen. *Animal Reproduction Science* 2002; 62: 143-172

Karaji RO, Kia HD, Ashrafi I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze–thaw bull sperm. *Cell Tissue Bank* 2014; 15: 461-70.

Lee K, Dabrowsky K. Long-term effect and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch *Perca flavescens*. *Aquaculture* 2004; 230: 377–389.

Leon-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Martinez-Hernandez FJ, Moreno JM, Vargas A, Martinez F, Soria B. Developing biological resource banks as a

supporting tool for wildlife reproduction and conservation the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Ani Reprod Sci* 2009; 112: 347–361.

Lichtenstein G, Elisio M, Miranda LA. Development of sperm cryopreservation techniques in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 2010; 306: 357–361.

Martínez Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Herráez, M.P., Sarasquete, C., Cabrita, E., 2012. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved seabass sperm. *Theriogenology* 77, 1129–1136.

Mansour N, McNiven MA, Richardson GF. The effect of dietary supplementation with blueberry -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) sêmen. *Theriogenology* 2006; 66: 373–382.

Mazur P, Rall WF, Leibo SP. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophysics* 1984; 3: 197-213

Menezes TBJ, Queiroz LJ, Doria CRC, Menezes Jr JB. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amazonica* 2008; 38: 365 – 368.

Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D & Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull sêmen. *Theriogenology* 2012; 57: 695-1706.

Muniz J. Influência do LHRH comum na ovulação induzida do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Characiforme, Characidae), em diferentes fotoperíodos (dissertação de mestrado), Pernambuco. Universidade Federal Rural de Pernambuco 2006.

Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MAM, Viveiros ATM. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science* 2010; 118: 324–329.

Nakaghi LSO, Mitsuiki D, Santos HSL, Pacheco MR, Ganeco LN. Morphometry and morphology of nucleus of the Sertoli and interstitial cells of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1881) (Pisces: Characidae) during the reproductive cycle. *Brazilian Journal of Biology* 2003; 63: 97-104.

Pegg DE. Principles of Cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2ed. Totowa, NJ, Humana Press 2007; 368: 39-58.

Perumal P, Selvaraju S, Selvakumar S, Barik A, Mohanty D, Das S, Das R, Mishra P. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in sêmen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reprod Domest Anim* 2011; 46: 636–641.

Poulos A, Darin-Bennett A, White IG. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1973; 46: 541-549.

Resende EK, Marques DKS. Criopreservação de sêmen de peixe. Corumbá: Embrapa Pantanal Circular Técnica 2009; 84: 1-5.

Sarvi K, Niksirat H, Mojazi Amiri B, Mirtorabi SM, Rafiee GR, Bakhtiyari M. Cryopreservation of sêmen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture* 2006; 256:564 –9.

Soares MGM, Da Costa EL, Siqueira-Souza FK, Dos Anjos HDB, Yamamoto KC, Freitas CEC. Peixes de lagos do Médio Rio Solmões 2008; 2:1-160.

Sipko, TP; Rautian GS, Udina IG, Strelchenko NS. Conservation of genetic material from endangered and economically important ungulate species in establishment of cryobanks *Physiology and General Biology Reviews* 1997; 13: 35-98.

Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* 2007; 67:1249–1255.

Tuncer PB, Sariözkan S, Bucak MN, Ulutas PA, Akalin PP, Büyükleblebici S, Canturk F. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* 2012; 75: 1459 –1465.

Varela Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MVF, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia Jr T, Deschamps JC. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog sêmen. *Anim. Reprod. Sci* 2009; 115: 323–327

Varela Junior A.S; Corcini C.D, Streit Jr D.P, Rizzoto G, Jardim R.D, Lucia Jr, T ; Figueiredo M. R. C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido o congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma Macropomum*. *Atlântica, Rio Grande*, 2012; 34: 129-137.

Varela Junior A.S; Corcini C.D, Streit Jr D.P, Rizzoto G, Jardim R.D, Lucia Jr, T ; Figueiredo M. R. C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido o congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma Macropomum*. *Atlântica, Rio Grande*, 2012; 34: 129-137, 2012.

Viveiros ATM, Oliveira AV, Maria AN, Orfão LH, Souza JS. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 2009; 61: 883-889.

Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Allaman IB. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sêmen. *Animal Reproduction Science* 2009;112 :293–300.

Viveiros ATM, Amaral TB, Orfão LH, Isau ZA, Caneppe D, Leal MC. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research* 2011; 42: 858 – 865.

Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 1997; 49: 921-5.

Willdt DE . Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. Elsevier Science Publishers BV: Amsterdam *Animal Reproduction Science* 1992; 28: 247-257.

CAPÍTULO 1

Glutathione Reduzida e Adenosina trifosfato (ATP) na criopreservação seminal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*

“Manuscrito a ser submetido para a revista Theriogenology.”

Glutathiona Reduzida e Adenosina trifosfato (ATP) na criopreservação seminal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*

Fernanda Alves Pereira^a, Carine Dahl Corcini^{bc}, Alessandra Cardoso da Silva^d,
Diego Martins Pires^d, Jéssica Ribeiro Pereira^a, Stela Mari Meneghello Gheller^d,
Alexandre Nizio Maria^e, Antonio Sergio Varela Junior^{bc*}

^aPrograma de pós graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande,
RS, Brasil

^bReprodução Animal Comparada- RAC, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

^cReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS,
Brasil

^dPrograma de pós graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

^eEmbrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil

*Autor correspondente Tel.: + 55 53 32935186; fax: + 55 53 32336633.
E-mail address: antoniovarela@furg.br (A.S. Varela Junior)

Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito de glutathiona reduzida (GR) e adenosina trifosfato (ATP) em espermatozoides criopreservados de tambaqui, *Colossoma macropomum*. As amostras de sêmen foram congeladas em diferentes concentrações de GR (2, 4 e 6 mM) e ATP (7,5, 15, 30 mM) avaliados isoladamente; As diferentes concentrações de GR e ATP foram adicionados ao diluente Beltsville Thawing Solution com 10% de DMSO (diluente controle). O sêmen descongelado foi avaliado quanto a parâmetros de cinética pela *Computer Assisted Sêmen Analysis* (CASA) e parâmetros de funcionalidade celular por citometria de fluxo. Todas as concentrações de GR e ATP tiveram redução gradativa na produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente ATP 15; 22,5 mM e 30 mM, que diminuiram 50%

ou mais, quando comparado ao controle. Todas as concentrações de GR e ATP não alteraram ($P > 0,05$) a fragmentação de DNA e peroxidação lipídica. A fluidez de membrana do GR, nas concentrações 4 e 6 mM foram melhores que o controle; sendo que as concentrações de 2 e 4 mM mantiveram com mais eficiência o período de motilidade, motilidade total e progressiva. Dessa forma, indicamos a utilização do diluente BTS com 10% de DMSO adicionado de 4 mM de GR em espermatozoides descongelados de Tambaqui, *C. macropomum*.

Palavras-chave: Antioxidante, conservação, espermatozoides, peixe, ROS.

1. Introdução

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier1818) é originário da bacia Amazônica e amplamente distribuído em seus afluentes. A espécie realiza migração reprodutiva e desova no verão que coincide com a estação de cheias (Godinho 2007). Em ambientes naturais alimenta-se de frutos e sementes, especialmente no período de reprodução, que precisam de aporte energético para maturação gonadal (Vieira et al 2011). Desse modo, tem grande importância ecológica nos ecossistemas amazônicos, pois auxilia na propagação de sementes a longas distâncias (Anderson et al 2011). No entanto, o aumento da ação antrópica pelo desmatamento da mata ciliar (Claro Jr et al 2004), construção de barragens e hidrelétricas diminuem a diversidade genética e prejudicam sua reprodução (Isaac e Ruffino 1996).

A criopreservação é uma ótima ferramenta para criação de bancos de germoplasma possibilitando recuperar e preservar espécies ameaçadas de extinção através da conservação de biodiversidade (Cabrita et al 2010, Martínez-Páramo et al 2009). Por outro lado, o congelamento e descongelamento ocasiona danos devido ao choque térmico (Bucak et al 2008, Wang et al 1997) e rápido restabelecimento do metabolismo pela reidratação das células espermáticas (Holt 2000). Durante o procedimento, ocorre à formação de cristais de gelo intra e extracelular, geram lesões mecânicas às organelas celulares (Cabrita et al 2005) e diminuem a motilidade espermática (Chatterjee et al 2001). Além disso, em espermatozoides descongelados ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Gadea et al 2011) e

redução do sistema antioxidante, que são menores devido à diluição em diluentes de congelamento (Cabrita et al 2011).

O aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) suprime a capacidade do sistema de defesa do plasma seminal e leva ao estresse oxidativo (Bansal e Bilaspuri 2011). Todos componentes celulares estão sujeitos a danos oxidativos, entretanto, as membranas celulares são particularmente suscetíveis, por sua alta composição de ácidos graxos poli-insaturados (Martínez-Páramo et al 2012, Agarwal et al 2005). A desestabilização dos fosfolípidios leva a perda de permeabilidade seletiva (Hazel et al 1984), da viabilidade dos gametas, e da capacidade de fertilização do oócito (Stejskal et al 2008, Aitken 2006). Entre todos antioxidantes a glutathione, nas formas reduzida e não reduzida, é amplamente encontrada em diferentes tipos celulares (Bucak et al 2008), entretanto foi demonstrado que após o congelamento/descongelamento ocorre redução de 64 % no conteúdo de Glutathione em espermatozoides de bovinos (Stradaioli et al 2007, Bilodeau et al 2001), 32% em humanos (Gadea et al 2011) e 78 % em suínos (Gadea et al 2004).

Nos últimos anos, antioxidantes tem sido adicionados em espermatozoides criopreservados de mamíferos, no entanto, os resultados não foram promissores (Buranaamnuay et al 2011, Gadea et al 2004). Por esta razão, Karaji et al (2014) sugeriu a utilização de combinações de diferentes concentrações de glutathione reduzida e superóxido dismutase e observou melhora na motilidade total e progressiva em espermatozoides de bovinos. Em truta arco íris, o uso dos antioxidantes ácido úrico, metionina, superóxido dismutase, glutathione reduzida, tocoferol e carnitina isolados aumentaram o período de motilidade em relação ao controle (Kutluyer et al 2014). Até o momento, a utilização de antioxidantes isolados no congelamento espermático em peixes nativos brasileiros não foi realizada.

A motilidade espermática é crucial para garantir o sucesso reprodutivo, e depende de aspectos intracelulares como produção de ATP e estrutura flagelar (Cabrita et al 2010). O conteúdo de ATP é fonte principal para gerar o movimento flagelar e garantir o sucesso reprodutivo. No entanto, o armazenamento dos gametas reduz ATP intracelular, e conseqüentemente, o tempo e velocidade da motilidade espermática (Aramli et al 2013). A adição de ATP exógeno aumentou a movimentação dos espermatozoides e as taxas de fertilização artificial em ratos (Rodríguez-Miranda et al 2008), bovinos(Luria et al 2002) e humanos (Foresta et al

1992). A redução da permeabilidade seletiva causada pelo processo de quiescência e restauração do metabolismo normal pela criopreservação leva a perda de ATP armazenado. Assim, o ATP extracelular entra na célula espermática, minimiza sua depleção e aumenta a viabilidade celular (Blanco et al 2011). Até o presente momento, nenhuma pesquisa adicionou ATP extracelular em armazenamento de espermatozoides de peixes teleósteos.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi adicionar o antioxidante Glutathione reduzida (GR) e ATP exógeno, em diferentes concentrações na suplementação do diluente de congelamento de espermatozoides de Tambaqui, *C. macropomum*.

2.0 Metodologia

Este estudo foi desenvolvido segundo as diretrizes do comitê de ética da Universidade Federal de Rio Grande (CEUA 015/2015). As coletas e análises iniciais do semen fresco e o congelamento seminal foram realizados na Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju (SE, Brasil) e o descongelamento e análises posteriores na Universidade Federal de Pelotas. Todos os produtos químicos utilizados nos experimentos foram obtidos da Sigma Chemical Company® (St. Louis, MO, EUA).

2.1 Coleta espermática

Durante a época reprodutiva da espécie *C. macropomum*, 15 machos, 15 em cada experimento, ($8,0 \pm 5,0$ kg; CT: 70 ± 66 cm) maduros sexualmente foram selecionados na Piscicultura Santa Clara, localizada no município de Propriá (SE, Brasil). Os machos foram induzidos hormonalmente com injeção intramuscular de extrato de hipófise de carpa (2mg/kg peso vivo), para aumentar o volume seminal. Os animais foram mantidos em tanque com água a temperatura controlada de 28°C. Após 10 horas cada macho foi retirado do tanque e seco com toalha, o poro urogenital foi seco com papel absorvente. Através de massagem abdominal as amostras foram coletadas em tubos cônicos de 15 mL, e acondicionadas em isopor com gelo (evitando seu contato direto) à temperatura de 8°C. As amostras que ocorreu contaminação por fezes, urina, sangue ou água foram descartados.

2.2 Avaliação inicial

Todos machos apresentaram motilidade superior a 80% antes do congelamento, sendo avaliados em microscópio óptico com contraste de fases na magnificação de 200X (BX - Olympus 41). A ativação espermática foi feita com 1µL de amostra e 4µL solução de NaHCO₃ (Carneiro et al 2012), em lâmina sob lamínula.

As amostras conservadas a 8°C foram transportadas até o laboratório Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, SE) para o congelamento nos diferentes tratamentos. Uma alíquota de sêmen foi diluído na proporção 1:2000 em 4% de formalina, para avaliação na câmara de Neubauer em microscópio óptico de contraste de fases (BX Olympus 41) para determinação da concentração espermática.

2.3 Criopreservação

O diluente base *Beltsville Thawing Solution* (BTS: mOsm 320; pH 7,2) composto por 37 g de glicose, 6 g citrato de sódio, 1.25 g bicarbonato de sódio, 1.25 EDTA, 0.9 g cloreto de potássio em 1L de água destilada (Pursel 1975). As diferentes concentrações de GR e ATP isolados foram adicionados ao diluente (base e controle) BTS com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Varela Junior et al 2012).

Este experimento apresentou um total de 8 tratamentos (controle; GR 2; 4; 6 mM e ATP 7,5; 15; 22,5 e 30 mM). As amostras de sêmen foram diluídas e homogeneizadas em cada um dos tratamentos na concentração final de 800 milhões de células por mL (Varela Junior et al 2015). Os tratamentos contaram com 4 repetições, totalizando 480 amostras. Após, foram envasadas em palhetas de 250 µL, vedadas com álcool polivinílico e acondicionadas em racks de alumínio. As racks permaneceram a temperatura ambiente (22°C) por 20 min para estabilizar a ação do GR e ATP sobre as células espermáticas. Em seguida, as amostras foram expostas em botijão dry shipper de vapor de nitrogênio (MVE™, SC4 / 2V, GA, EUA), por 12 horas, e transferidas para botijão de nitrogênio líquido (MVE™, VOLTA 34, GA, USA) a -196°C, ficando armazenadas por no mínimo 30 dias (Varela Junior et al 2012).

2.4 Descongelamento

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 45°C por 8 s e colocadas em microtubos de 1,5 µL (Streit Jr DP et al 2006). Após foram feitas análises de cinética espermática e estruturas celulares.

2.5 Análise de cinética espermática

Os espermatozoides descongelados foram ativados (ver item 2.2) e gravados pelo *Computer Assisted Sêmen Analysis* (CASA) (Dziewulska et al 2011). Foram capturados 10 campos com mínimo 1000 células, a ativação para a captura dos campos foram repetidos 3 a 5 vezes. Os parâmetros avaliados 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 (µm/s), retilinearidade STR (VSL / VAP, %), linearidade LIN (VSL / VCL, %), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça ALH (µm), frequência de batimento cruzado BCF(Hz) (Dziewulska et al 2011). O tempo de motilidade foi avaliado no momento da ativação até a parada do movimento progressivo dos espermatozoides (Sorensen 1979).

2.6 Citometria de Fluxo

Para as avaliações de fluidez de membrana, fragmentação de DNA, peroxidação lipídica, integridade de membrana e mitocôndria, rompimento celular e espécies reativas de oxigênio foi utilizado o equipamento Attune Acoustic Focusing ® (Life Technologies) equipado com laser azul (Argônio 488 nm) e laser violeta (UV 405 nm). As análises foram realizadas pelo software versão 2.1 (Life Technologies). Para a detecção de todas as avaliações foi utilizado laser violeta de 405 nm (450/40, VL-1). As populações de células espermáticas foram coradas com Hoechst 33342 na concentração de 16.2 mM, exceto na fragmentação de DNA que não se utilizou (Martinez-Alborcia et al 2012). Os eventos não espermáticos foram descartados por gráficos de dispersão FSC x SSC e Hoechst 33342 negativo. Para a leitura de todos os parâmetros, as células coradas com fluoróforos foram adicionada em PBS livre de cálcio (80g de NaCl, 11,5gde KCl, 24g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄ em 1L água milique), usando o total de 10.000 espermatozoides por análise.

Integridade de membrana e Rompimento celular

A integridade de membrana foi verificada através dos fluoróforos Sybr14 e iodeto de propídio (IP) (Minitübe, Tiefenbach, Germany). A alíquota de sêmen descongelado foi incubado por 5 min sonda fluorescente contendo 0,25 μM de Sybr14 e 7,5 μM IP conforme instruções do fabricante - Minitübe. Os espermatozoides foram classificados como não lesados e com membrana funcional (Sybr + / IP-) e lesados e/ou com membrana não funcional (Sybr + / IP +; Sybr- / IP +; Sybr- / IP-) (Figuroa et al 2015). Para verificar a percentagem de rompimento celular, as células que apresentaram IP + foram classificadas como rompidas, as células que apresentaram IP - foram classificadas como não rompidas.

Fluidez de Membrana

A verificação para Fluidez de membrana utilizou 2,7 μM corante merocianina hidrofóbico 540 (M540) e 0,1 μM de YO PRO-1 (Invitrogen - Eugene, OR, EUA) em 10 μL de amostra descongelada por 5 min. Foram avaliadas células de alta fluidez (alta concentração de M540) e baixa fluidez (baixa concentração de M540), apenas para os espermatozoides íntegros (YO-PRO negativo) (Fernández-Gago et al 2013). A taxa de fluidez de membrana foi calculada através do número de espermatozoides com baixa fluidez/ número de espermatozoides com baixa fluidez + espermatozoides com alta fluidez *100.

Funcionalidade de Mitocôndria

A funcionalidade de mitocôndria foi verificada com 3,1 μM de Rhodamina 123 (fluorescência verde), e 7,5 μM de IP em 10 μL de amostra descongelada por 5 min. As células espermáticas foram classificadas quanto à alta funcionalidade (alta fluorescência pela acumulação de Rhodamina) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência, baixa acumulação de Rhodamina), sendo avaliados apenas espermatozoides intactos (IP negativo) (Liu et al 2015). A taxa de funcionalidade de mitocôndria foi calculada através do 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.

Índice de fragmentação de DNA

A integridade de DNA foi avaliada pelo ensaio da estrutura de cromatina (SCSA). Para verificação desse parâmetro, 10µL de espermatozoides descongelado foi adicionado a 5µL de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10µL de Triton 1X (Triton X-100, 1%) (v / v) com intervalos de 30 segundos. O corante acridine orange é adicionado e incubado por 30 s não ultrapassando o tempo de 2 min, para fazer a leitura. Os espermatozoides foram classificados quanto DNA integro (verde) e fragmentado (laranja/vermelho) (Jenkins et al 2015). A taxa de fragmentação de DNA foi calculada através do número de espermatozoides com DNA integro/número de espermatozoides DNA integro + espermatozoides com DNA fragmentado *100.

Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

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

Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica dos espermatozoides foi avaliada logo depois de descongelados. Foi adicionada a concentração final de 1µM Bodipy C11 (Hagedorn et al 2012) em 10 µL de amostra, e incubados por 2 horas a temperatura ambiente (20°C), sendo analisados apenas espermatozoides vivos. A taxa de peroxidação lipídica foi calculada através da intensidade mediana de fluorescência verde (lipídio peroxidado) / intensidade mediana de fluorescência verde + intensidade mediana de fluorescência vermelha (lipídio não peroxidado) *100.

2.7 Análise estatística

As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, seguidas por análise de variância (ANOVA) por teste de Tukey. Os tratamentos foram considerados variáveis independentes, e os parâmetros tempo de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, integridade de membrana, fluidez de membrana, funcionalidade de mitocôndria, índice de fragmentação de DNA, ROS, peroxidação lipídica, rompimento celular foram considerados variáveis dependentes. Todas as análises foram feitas pelo software Statistix® 9.0 (Statistix 2008).

3.0 Resultados

O volume total de sêmen fresco foi $4,0 \pm 0,5$ mL, a motilidade espermática foi 96 ± 10 e o período de motilidade foi 130 ± 7 s.

Na análise motilidade total e progressiva, o tratamento GR 4 mM foi superior ao controle ($P < 0,05$) e as concentrações de ATP (7,5, 15, 22,5, 30 mM) e 6 mM não apresentou diferença do controle ($P > 0,05$), já 0 GR2 foi superior somente na motilidade progressiva e período de motilidade (Tab. 1).

Na análise de fluidez de membrana, o melhor resultado foi nos tratamentos GR 4 e GR 6 que diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) do controle (Tab. 2). Nos parâmetros fragmentação de DNA, peroxidação lipídica e integridade de mitocôndria os tratamentos não diferiram do controle ($P > 0,05$) (Tab. 2). Com relação à integridade de membrana o tratamento ATP 22,5 diferiu do controle e obteve a melhor média de membranas íntegras (60%) ($P < 0,05$) (Tab. 2). Os demais tratamentos de ATP (7,5, 15, 30 mM) e GR (2 mM) não diferiram ao controle ($P > 0,05$) (Tab. 2).

As amostras congeladas com ATP 15 mM ($P > 0,05$), ATP 22, 5 e 30 mM ($P < 0,05$) diminuíram a produção de ROS em mais de 50% em relação ao controle. Os tratamentos ATP 7,5 mM, 4 mM, 6 mM não diferiram entre si e não foram superiores ao controle ($P > 0,05$) (Tab. 2). Os tratamentos com ATP 22,5 mM e ATP 30 mM mantiveram melhor a integridade celular nas amostras congeladas quando comparadas com o controle ($P < 0,05$) (Tab. 2).

4.0 Discussão

Este é o primeiro estudo utilizando ATP e GR na criopreservação seminal de *C. macropomum*, peixe nativo brasileiro. Neste estudo a adição dos antioxidantes diminuiu a disponibilidade de espécies reativas de oxigênio, estabilizou a fluidez e integridade de membrana citoplasmática. Dentre os tratamentos de GR, as concentrações 2 e 4 mM apresentaram performances superiores nas avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e tempo de motilidade em relação ao controle. Entre as concentrações de ATP 15, 22,5 e 30 mM reduziram em 50% as espécies reativas de oxigênio em relação ao controle.

A Glutathione reduzida nas concentrações 4 mM e 6 mM melhoraram a fluidez de membrana comparados ao controle, e as concentrações de 2 e 4 mM, mantiveram com mais eficiência o período de motilidade, motilidade total e progressiva. Da mesma maneira, estes tratamentos melhoraram os parâmetros de movimentação por estabilizar as estruturas celulares garantindo viabilidade dos gametas. Dessa forma, a GR reduziu os danos oxidativos ocasionados pelo desequilíbrio do sistema antioxidante e da formação de espécies reativas de oxigênio (Bansal e Bilaspuri 2011). A estabilização da membrana citoplasmática conservou as vias metabólicas, como Fosforilação oxidativa, permitindo produção de ATP para geração de batimento flagelar, e conseqüentemente, maiores taxas de motilidade.

A motilidade é o parâmetro mais utilizado para avaliar a qualidade dos gametas entre as espécies, pois o movimento espermático garante a fertilização do oócito. É evidente que a qualidade de espermatozoides congelados é menor quando comparados a espermatozoides *in natura*, especialmente, pela redução do conteúdo de antioxidantes como glutathione reduzida e aumento de espécies reativas de oxigênio (Gadea et al 2011). Nesse sentido, diversos estudos suplementando o congelamento com GR mantiveram as taxas de movimentação corroborando com este estudo (Gadea et al 2013).

Kutluyer et al (2014) adicionando glutathione reduzida de forma isolada no diluente de congelamento para de truta arco iris observaram aumento na duração e taxa de motilidade de espermatozoides descongelados. Estes estudos mostram que eficácia da adição de antioxidantes de forma isolada confere maior qualidade nas células espermáticas descongeladas.

Os resultados de ROS apresentaram o mesmo padrão nas maiores concentrações de GR e ATP conferiram menor produção de ROS em relação ao controle. Em virtude disso, ocorreu redução de ataque das ROS aos ácidos graxos poli-insaturados, que compõem a membrana plasmática (Lahnsteiner et al 2009). Dessa forma, as membranas tornam-se menos fluidas e mais íntegras, pela estabilização dos fosfolipídios, e conseqüentemente, aumentou integridade mitocôndria e integridade celular das amostras. Com isto, o número de células em movimento aumentou, o que foi visível no acréscimo de motilidade total e progressiva, entretanto ela não agiu diretamente sobre o metabolismo de cada célula, não aumentando a VCL, VSL ou BCF.

Mesmo com a adição da ATP nas concentrações 22, 5 e 30 mM foram eficazes para redução de produção de espécies reativas de oxigênio, não alterando as organelas, esta energia disponível não foi eficaz para que se obtivesse um aumento de batimentos flagelares. Provavelmente, a desorganização da bicamada lipídica decorrente do congelamento permite a entrada do ATP exógeno (Blanco et al 2011), que normalmente é impermeável à membrana plasmática, reduzindo a produção de ROS, porém pode se sugerir que a célula espermática não utiliza essa fonte de energia para aumentar sua motilidade. A adição de GR exógeno promoveu um equilíbrio entre produção de ROS e sistema antioxidante, que é reduzido após o congelamento pela diluição nas soluções de criopreservação (Cabrita et al 2011).

Além disso, GR e ATP promoveram proteção ao DNA devido às altas percentagens de integridade (99,4; 97,2). Estudos adicionando antioxidantes nos diluentes de congelamento obtiveram resultados similares a esta pesquisa, pois diminuem fragmentação (Öğretmen et al 2015) e os danos (Cabrita et al 2011) no DNA. Gadea et al (2005) observou baixos níveis de condensação da cromatina com a adição de Glutathione e sugeriu que presença deste tripeptídeo reduziu o estresse oxidativo, a oxidação dos tióis, e a hipercondensação da cromatina espermática. Da mesma forma, isto pode ter ocorrido neste estudo que apresentou baixas taxas de fragmentação (2,8%, 0,6%).

Na busca de melhores informações que possibilitem um diluente capaz de preservar a qualidade seminal, a adição de GR não melhorou os indicadores de componentes celulares. Porém a mesma manteve com mais eficiência a cinética espermática do sêmen fresco, promovendo maior motilidade total, progressiva e período de motilidade quando comparado ao tratamento controle. Desta forma,

indicamos a utilização do diluente BTS com 10% de DMSO adicionado de 4 mM de GR em espermatozoides descongelados de *C. macropomum*.

5.0 Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brasília , DF, Brasil) pelas bolsas de pós graduação atribuída a F. A. Pereira, A. C. Silva, D. M. Pires; J. R. Pereira. Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo financiamento a este trabalho científico (Fapergs nº 15247.317.15427.22052014). C. D. Corcini é pesquisadora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 306356/2014-7). Agradecemos aos membros do grupo Reprodução Animal Comparada (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS , Brasil) por a sua assistência.

6.0 Referências bibliográficas

Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molec and Cellr Endoc* 2006; 250: 66–69.

Agarwal A, Sushil AP, Tamer MS. Minireview Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm *Jour of Androl* 2005; 26: 1-6.

Anderson JT, Nuttle T, Rojas JSS, Pendergast TH, Flecker AS. Extremely long-distance seed dispersal by an overfished Amazonian frugívora. *Proc Roy Soc* 2011; 278: 3329–3335.

Aramli MS, Kalbassi MR, Nazarib RM, Aramli S. Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. *Animal Reprod Scie* 2013; 143: 112– 117.

Bansal AK, Bilaspuri GS. Review Article, Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Sêmen Functions. *Veterin Medic Intern* 2011, 1-7.

Bilodeau, JF, Blanchette S, Gagnon IC, Sirard MA. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull sêmen. *Theriogenology* 2001; 56: 275–286.

Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 2011; 123: 242–248.

Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram sêmen after the freeze–thawing process. *Small Rum Resea* 2008; 75: 128–134.

Buranaamnuay K, Grossfelda R, Struckmann C, Rath D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science* 2011; 127: 56– 61.

Cabrita E, Robles V, Cuñado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology* 2005; 50: 273–284.

Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* 2010; 26 623–635.

Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT. The influence of certain amino acids and vitamins in post-thawfish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim Reprod Sci* 2011; 125: 189–195.

Carneiro PCF, Azevedo HC, Santos JP, Maria AN, Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sêmen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods, *CryoLetters* 2012; 33: 385–393.

Chatterjee S, De Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation Alters Membrane Sulfhydryl Status of Bull Spermatozoa: Protection by Oxidized Glutathione. *Molecular Reproduc and Develop* 2001; 60: 498-506.

Claro JR, Ferreira E, Zuanon J, Araujo-lima C. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. *Acta amaz* 2004; 34: 133 – 137.

Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim* 2011; 46: 393–403.

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

Fernández-Gago R, Domínguez JC, Martínez-Pastor F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology* 2013; 80: 400–10.

Figueroa E, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Sánchez R, Effer B, Isachenko E, Farias JG, Valdebenito I. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 2015; 83: 238–245.

Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F. Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Biol Chem* 1992; 267:19443–19447.

Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 2004; 62:690–701 .

Gadea J, Gumbao D, Matas C, Romar R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology* 2005; 26: 749–756.

Gadea MM, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011; 62: 40–46.

Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez B, Gardón JC. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive biology* 2013;13: 24–33.

Godinho HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Reprod Anim* 2007; 3: 351-360.

Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, Meyers SA Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLoS ONE* 2012 7: e39397.

Hazel JR. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Amer Jour Physiol* 1984; 246: 460-470 .

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of sêmen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62 3–22.

Isaac VJ, Ruffino ML Population dynamics of Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, in the Lower Amazon, Brazil. *Fish Manag Ecol* 1996; 3: 315 –333.

Jenkins JA, Draugelis-Dale RO, Pinkney AE, Iwanowicz LR, Blazer VS. Flow cytometric method for measuring chromatin fragmentation in fixed sperm from yellow perch (*Perca flavescens*). *Theriogenology* 2015; 83: 920–931.

Karaji RO, Kia HD, Ashrafi I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm Cell Tissue Bank 2014; 15:461-70.

Kutluyer F, Kayim M, Ögretmen F, Büyükleblebici S, Tuncer BP. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. Cryobiology 2014; 69: 462–466.

Lahnsteiner F, Mansour N, McNiven MA, Richardson GF. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sêmen: Composition and effects on sperm functionality. Aquaculture 2009; 298:118 –24.

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 2015; 41:413–422.

Luria A, Rubinstein S, Lax Y, Breitbart H. Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. Biol Reprod 2002; 66:429–437.

Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. PLoS One 2012; 7, e36550.

Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JA, 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.

Martínez-Páramo S, Diogo P, Beirão J, Dinis MT, Cabrita E. Sperm lipid peroxidation is correlated with differences in sperm quality during the reproductive season in precocious European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) males. Aquaculture 2012; 358: 246–252 .

Öğretmen F, İnanan BE, Kutluyer F, Kayim M, Effect of sêmen extender supplementation with cysteine on post-thaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the comMon carp (*Cyprinus carpio*), *Theriogenology* 2015; 83: 1548–1552.

Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated sêmen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 1975; 40: 99 –102.

Rodríguez-Miranda E, Buffone MG, Edwards SE, Ord TS, Lin K, SamMel MD, Gerton GL, Moss SB, Williams CJ. Extracellular Adenosine Triphosphate Alters Motility and Improves the Fertilizing Capability of Mouse Sperm. *Biol of Reproduc* 2008; 79: 164–171.

Sorensen AM Laboratory for animal reproduction. Massachusetts. American Press 4^a ed 1979; 76: 300–311.

Statistix 9.0®. 2008. Statistix for Windows User's manual. Tallahassee: Analytical 447 software. 448.

Stejskal K, Svobodova Z, Fabrik I, Adam V, Beklova M, Rodina M, Kize R. Content of 269 cysteine, reduced and oxidized glutathione in spermatozoa of representatives of *Acipenseriformes* (*Acipenser baerii* and *A. ruthenus*) as well as teleosts (*Perca fluviatilis* and *Sander lucioperca*). *J Appl Ichthyol* 2008; 24: 519–21

Stradaioli G, Noro, T L, Sylla MM. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* 2007; 67: 1249–1255.

Streit Jr DP, Benites C, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Caldieri RF. Sêmen pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cryopreserved with diluents used for swine semen. *Ciência Animal Brasileira* 2006; 7: 289–297.

Varela Junior AS; Corcini CD, Streit Jr DP, Rizzoto G, Jardim RD, Lucia Jr T, Figueiredo MRC. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido o congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma Macropomum*. Atlântica, Rio Grande 2012; 34:129-137.

Varela Junior AS, Goularte KL, Alves JP, Pereira FA, Silva EF, Cardoso TF, Jardim RD, Streit Junior DP, Corcini CD. Methods of cryopreservation of Tambaqui sêmen, *Colossoma macropomum*. Animal Reproduction Science 2015; 157: 71–77.

Vieira MJAF, Carvalho MAM, Salmito-Vanderley CSB, Salgueiro CC de M, Viveiros ATM, Moura AAAN e Nunes JF. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. Arch Zootec 2011; 232: 1263-1270.

Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology 1997; 49: 921-5.

ANEXOS

Tabela 1: Análises de cinética de espermatozoides descongelados *C. macropomum* com GR e ATP isolados (mM). Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

	Tratamentos Antioxidantes							
	Controle	ATP 7,5	ATP 15	ATP 22,5	ATP30	GR 2	GR4	GR6
MotTot(%)	30,3 ± 1,11 ^b	31,7 ± 1,46 ^b	28,9 ± 1,33 ^b	21,8 ± 1,14 ^c	19,1 ± 0,99 ^c	34,6 ± 1,45 ^{ab}	38,1 ± 1,73 ^a	30,7 ± 1,54 ^b
MotProg (%)	20,6 ± 0,89 ^c	22,8 ± 1,28 ^{bc}	19,4 ± 1,11 ^{cd}	15,6 ± 0,97 ^{de}	12,9 ± 0,83 ^e	25,7 ± 1,36 ^{ab}	29,4 ± 1,49 ^a	21,6 ± 1,28 ^{bc}
PMot (s)	50,9 ± 4,09 ^b	52,5 ± 3,32 ^b	11,6 ± 2,93 ^c	1,0 ± 0,3 ^c	1,1 ± 0,4 ^c	74,4 ± 4,05 ^a	62,9 ± 3,84 ^{ab}	60,9 ± 4,39 ^{ab}
DAP (µm)	14,3 ± 0,28 ^{ab}	14,1 ± 0,30 ^{ab}	13,4 ± 0,34 ^{bc}	12,3 ± 0,31 ^c	13,8 ± 0,36 ^{ab}	14,7 ± 0,26 ^{ab}	15,0 ± 0,32 ^a	14,4 ± 0,37 ^{ab}
DSL	10,7 ± 0,21 ^{ab}	10,0 ± 0,23 ^{bc}	9,38 ± 0,21 ^c	9,13 ± 0,20 ^c	9,74 ± 0,18 ^c	11,1 ± 0,21 ^a	10,9 ± 0,23 ^{ab}	11,1 ± 0,33 ^a
DCL (%)	18,9 ± 0,41 ^a	19,4 ± 0,47 ^a	18,5 ± 0,55 ^{ab}	16,6 ± 0,58 ^b	18,5 ± 0,60 ^{ab}	19,2 ± 0,35 ^a	19,6 ± 0,52 ^a	18,5 ± 0,44 ^{ab}
VAP (µm/s)	33,3 ± 0,69 ^a	33,1 ± 0,71 ^a	32,0 ± 0,83 ^{ab}	29,0 ± 0,81 ^b	32,8 ± 0,94 ^a	33,8 ± 0,64 ^a	34,7 ± 0,81 ^a	33,3 ± 0,83 ^a
VSL (µm/s)	24,9 ± 0,50 ^a	23,4 ± 0,52 ^{ab}	22,4 ± 0,51 ^b	21,3 ± 0,50 ^b	23,2 ± 0,50 ^{ab}	25,5 ± 0,48 ^a	25,2 ± 0,57 ^a	25,6 ± 0,73 ^a
VCL (µm/s)	43,8 ± 1,04 ^{ab}	45,7 ± 1,11 ^a	44,3 ± 1,35 ^a	39,0 ± 1,50 ^b	43,9 ± 1,51 ^{ab}	44,3 ± 0,90 ^a	45,4 ± 1,28 ^a	42,6 ± 1,00 ^{ab}
STR	0,8 ± 0,07 ^{ab}	0,70 ± 0,07 ^c	0,70 ± 0,08 ^c	0,74 ± 0,01 ^{ab}	0,72 ± 0,01 ^{bc}	0,75 ± 0,07 ^{ab}	0,73 ± 0,09 ^{abc}	0,76 ± 0,07 ^a
LIN	0,58 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,08 ^c	0,52 ± 0,01 ^{bc}	0,58 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,01 ^{abc}	58 ± 0,09 ^a	0,57 ± 0,01 ^{ab}	0,60 ± 0,01 ^a
WOB	0,76 ± 0,09 ^{ab}	0,73 ± 0,07 ^b	0,73 ± 0,01 ^b	0,76 ± 0,01 ^{ab}	0,75 ± 0,09 ^{ab}	0,80 ± 0,06 ^{ab}	0,77 ± 0,08 ^a	0,78 ± 0,08 ^a
ALH	2,6 ± 0,08 ^{abc}	2,93 ± 0,10 ^a	2,89 ± 0,11 ^{ab}	2,85 ± 0,13 ^{abc}	2,97 ± 0,13 ^a	2,62 ± 0,08 ^{abc}	2,50 ± 0,09 ^{bc}	2,42 ± 0,07 ^c
BCF	23,8 ± 0,48 ^{abc}	22,1 ± 0,44 ^c	22,5 ± 0,41 ^{bc}	22,4 ± 0,55 ^c	24,0 ± 0,50 ^{abc}	23,4 ± 0,36 ^{abc}	24,4 ± 0,43 ^{ab}	24,9 ± 0,46 ^a

*Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), período de motilidade (PMot), distancia média percorrida (DAP), distância retilínea (DSL), distância curvilínea (DCL), velocidade média do percurso (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), Freqüência de batimento flagelar cruzado (BCF). Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística (P < 0,05).

Tabela 2: Análises de citometria de fluxo: fluidez de membrana citoplasmática (FM), integridade de membrana citoplasmática (IM), integridade celular (IC), espécies reativas de oxigênio (ROS), fragmentação de DNA (DNA), peroxidação lipídica (LPO), Potencial de membrana mitocondrial (PMit) de espermatozoides descongelados com GR e ATP isolados (mM). Os dados são expressos como média e erro padrão da média.

	Tratamentos Antioxidantes							
	Controle	ATP 7,5	ATP 15	ATP 22,5	ATP30	GR 2	GR4	GR6
FM (%)	56,7 ± 2,2 ^{bcd}	66,0 ± 2,8 ^{ab}	63,6 ± 2,1 ^{abc}	55,0 ± 3,2 ^{cd}	48,3 ± 3,2 ^d	65,7 ± 2,7 ^{abc}	70,0 ± 2,0 ^a	70,7 ± 1,5 ^a
IM (%)	40,0 ± 3,0 ^c	54,1 ± 2,3 ^{ab}	51,1 ± 3,5 ^{abc}	60,9 ± 3,0 ^a	55,6 ± 3,6 ^{ab}	47,9 ± 2,8 ^{abc}	51,0 ± 2,6 ^{abc}	47,0 ± 3,4 ^{bc}
IC (%)	61,5 ± 3,2 ^b	67,9 ± 2,5 ^{ab}	68,3 ± 3,1 ^{ab}	76,2 ± 2,0 ^a	73,8 ± 2,1 ^a	69,3 ± 2,0 ^{ab}	69,5 ± 2,6 ^{ab}	64,9 ± 3,5 ^{ab}
PMit (%)	59,8 ± 3,8 ^a	65,4 ± 3,9 ^a	63,5 ± 3,6 ^a	63,3 ± 3,2 ^a	60,5 ± 3,4 ^a	63,8 ± 3,3 ^a	62,9 ± 3,8 ^a	65,5 ± 2,9 ^a
ROS (%)	1142,8 ± 180,0 ^a	780,2 ± 86,3 ^{abcd}	507,5 ± 117,5 ^{bcd}	394,3 ± 47,7 ^{cd}	323,8 ± 70,6 ^d	1045,7 ± 178,9 ^{ab}	888,2 ± 133,5 ^{abc}	720,7 ± 134,0 ^{abcd}
LPO (%)	17,6 ± 2,7 ^a	17,5 ± 2,2 ^a	18,2 ± 2,1 ^a	18,7 ± 2,1 ^a	16,7 ± 2,1 ^a	16,1 ± 3,2 ^a	12,0 ± 1,3 ^a	13,0 ± 1,5 ^a
DNA (%)	98,5 ± 0,3 ^a	98,7 ± 0,2 ^a	98,9 ± 0,2 ^a	99,4 ± 0,1 ^a	99,2 ± 0,2 ^a	98,8 ± 0,2 ^a	98,5 ± 0,2 ^a	98,9 ± 0,3 ^a

^{a,b}Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística (P < 0,05).