



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



**Dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol na
criopreservação espermática do Suruvi,
Steindachneridion scriptum.**

Jéssica Ribeiro Pereira

Orientador: Antonio Sergio Varela Junior

Rio Grande
2017



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



**Dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol na criopreservação seminal
do Suruvi, *Steindachneridion scriptum*.**

Aluno: Jéssica Ribeiro 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
2017

Dedico esse trabalho aos meus pais,
José Carlos e Carla, e ao meu namorado,
Leandro Larrosa, por todo amor, apoio e compreensão!

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Iemanjá por me darem força e coragem para continuar.

Aos meus pais, José Carlos Pereira e Carla Pereira, não tenho palavras para agradecer por tudo até hoje! Sem vocês eu não teria conseguido, muiiiito obrigada!!!

Ao meu namorado, Leandro Larrosa, muiiiito obrigada por tudo!!! Muito obrigada por sempre me entender, me apoiar e nunca me deixar desistir.

À minha amiga Alessandra Cardoso, não só pela ajuda durante essa etapa mas pela amizade que se fortalece a cada dia.

À minha amiga Fernanda Alves, minha gêmea preferida, essa dissertação também é tua! Nunca vou ter palavras para te agradecer por tudo! E amiga: "TAREFA DADA É TAREFA CUMPRIDA!"

Ao meu amigo Diego Martins, por sempre acreditar que iríamos conseguir terminar os DNA's até às 18h! Tu foi dez comigo, obrigada!

Aos colegas do RAC, especialmente a Sara Lorandi, Andréia Anciuti e Marina Otte, Jorge Squeff Filho e Norton Gatti, obrigada pelas risadas, conselhos e ajuda! Todos vocês foram essenciais e muito obrigada por me acolherem tão bem.

Aos estagiários do REPROPEL (Monike Quirino, Nathália Knabah e o Rafael Mielke) e ao ex-estagiário do RAC, agora biólogo, Joziel Gonçalves por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Sergio, por confiar em mim quando eu mesma tinha dúvidas se conseguiria. Muito obrigada pelas oportunidades oferecidas durante esses 2 anos, cresci muito profissionalmente graças a ti.

À minha co-orientadora, Prof. Dra Carine, muito obrigada por sempre me auxiliar, ouvir e me acalmar.

À minha amiga-irmã Bruna Viera, por estar sempre ao meu lado e torcendo por mim!

À minha amiga Stephanie Stofel, muito obrigada!! Teu apoio foi essencial!

À minha amiga Pâmela Castro, por estar sempre na torcida desde o começo desse trajeto!

À minha colega e amiga Andréia Schwingel, muito obrigada! Te desejo todo sucesso do mundo e que o "meu amiguinho" só te traga coisas boas.

Aos colegas e professores do BAC que contribuíram para o meu aprendizado.

Ao professor Rodrigo Jardim, por todo auxílio durante o estágio docência.

Ao pessoal da Piscicultura Panamá, muito obrigada por nos acolherem tão bem.

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

Por fim, agradeço amigos e parentes que sempre estiveram na torcida e rezando por mim!

RESUMO

O *Steindachneridion scriptum*, peixe nativo brasileiro, está em perigo de extinção devido à fragmentação de seu habitat. Com isso, a conservação *ex situ* a partir do banco de germoplasma utilizando a criopreservação permite a proteção e recuperação dessa espécie. O objetivo do trabalho foi analisar o efeito dos álcoois dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e metilglicol nas concentrações de 5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15% na criopreservação espermática do *S. scriptum*. Cada tratamento foi diluído em *Betsville Thawing Solution* (BTS) e todas amostras foram avaliadas pelo *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) além de citometria de fluxo. As melhores médias de motilidade total e progressiva, referem-se ao metilglicol em todas concentrações e de metanol em 7,5 e 10% ($P < 0.05$), já o maior período de motilidade ao DMSO 5; 7,5 e 15%, além do metanol 5% e metilglicol em 7,5; 10; 12,5 e 15% ($P < 0.05$). Além metilglicol em 7,5% ($P < 0.05$) se destacar nas demais análises da cinética. Já produção de ROS diminuiu apenas com metilglicol 5% comparado ao DMSO 5% ($P < 0.05$), porém a LPO e a fragmentação do DNA não diferiram entre si ($P > 0.05$). O DMSO 5; 7,5 e 10%, conferiram maior integridade celular comparado ao metilglicol 5% ($P < 0.05$). No entanto, o metanol 12,5% possibilitou menor fluidez de membrana comparado ao DMSO 12,5% ($P < 0.05$), porém sua funcionalidade foi superior com DMSO 10 e 12,5% ($P < 0.05$) comparado ao metanol 10% e metilglicol 5% ($P > 0.05$). Por fim, as maiores funcionalidades mitocondriais foram obtidas com DMSO 12,5 e 15% diferenciando-se apenas do metilglicol 5% ($P < 0.05$). Dessa forma, o BTS adicionado de 7,5% de metilglicol foi o tratamento mais eficiente na criopreservação espermática do *S. scriptum*.

Palavras-chave: CASA, citometria de fluxo, conservação, germoplasma, peixe e esperma.

ABSTRACT

Steindachneridion scriptum, Brazilian native fish, is in danger of extinction due to the fragmentation of its habitat. With this, the ex situ conservation from the germplasm bank using cryopreservation allows the protection and recovery of this species. The objective of the present work was to analyze the effect of 5%, 7.5%, 10%, 12.5% and 15% concentrations on the sperm cryopreservation of *S. scriptum*, with the effect of the dimethylsulfoxide (DMSO), methanol and methylglycol alcohols. Each treatment was diluted in Betsville Thawing Solution (BTS) and Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) evaluated all samples in addition to flow cytometry. The best means of total and progressive motility, refer to methylglycol in all concentrations and methanol in 7.5 and 10% ($P < 0.05$), already the longest period of motility to DMSO 5; 7.5 and 15%, in addition to methanol 5% and methylglycol in 7.5; 10; 12.5 and 15% ($P < 0.05$). Besides methylglycol in 7.5% ($P < 0.05$), it stands out in the other kinetic analyzes. ROS production decreased only with methylglycol 5% compared to DMSO 5% ($P < 0.05$), but the LPO and DNA fragmentation did not differ among them ($P > 0.05$). DMSO 5; 7.5 and 10%, conferred higher cellular integrity compared to methylglycol 5% ($P < 0.05$). However, methanol 12.5% allowed lower membrane fluidity compared to DMSO 12.5% ($P < 0.05$), but its functionality was higher with DMSO 10 and 12.5% ($P < 0.05$) compared to methanol 10% and 5% methylglycol ($P > 0.05$). Finally, the major mitochondrial functionalities were obtained with DMSO 12.5 and 15% differing only from 5% methylglycol ($P < 0.05$). Thus, BTS added of methyl glycol 7.5% was the most efficient treatment in sperm cryopreservation of *S. scriptum*.

Key-words: CASA, flow cytometry, conservation, germplasm, fish and sperm.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
INTRODUÇÃO GERAL	10
O gênero	10
A espécie <i>Steindachneridion scriptum</i>	10
Banco de germoplasma	11
Criopreservação de sêmen.....	12
Diluidores e crioprotetores	14
Avaliação da motilidade espermática.....	15
Avaliação das funções espermáticas	17
Referências bibliográficas	18
CAPÍTULO 1.....	27
Resumo	2
Introdução.....	3
Materiais e métodos.....	5
Coleta espermática	5
Avaliação espermática <i>in natura</i>	6
Criopreservação.....	6
Descongelamento.....	7
Sistema de análise espermática computadorizada (CASA).....	7
Citometria de fluxo.....	7
Funcionalidade de membrana e rompimento celular	8
Fluidez de membrana	9
Funcionalidade de mitocôndria	9
Índice de fragmentação de DNA.....	10
Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	10
Peroxidação lipídica (LPO)	10
Análise estatística.....	11
Resultados	11
Discussão	13
Agradecimentos	16
Referências.....	16
Tabelas.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises da motilidade total, motilidade progressiva, tempo de motilidade, distância média percorrida, distância curvilínea, distância retilínea, velocidade média do percurso de espermatozoides descongelados do *Steindachneridion scpritum* (Miranda-Ribeiro 1918) com os álcoois dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol em diferentes concentrações (média \pm erro padrão).

Tabela 2: Análises de velocidade curvilínea, velocidade retilínea, retilinearidade, linearidade, oscilação, deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimento flagelar cruzado de espermatozoides descongelados do *Steindachneridion scpritum* (Miranda-Ribeiro 1918) com os álcoois dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol em diferentes concentrações (média \pm erro padrão).

Tabela 3: Análises das organelas espermáticas (funcionalidade mitocondrial, funcionalidade de membrana, integridade celular, fluidez de membrana, fragmentação de DNA) e da bioquímica (espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica) dos espermatozoides descongelados do *Steindachneridion scpritum* (Miranda-Ribeiro 1918) com os álcoois dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol (média \pm erro padrão).

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero

O gênero *Steindachneridion* (Eigenmann & Eigenmann 1919) é representante da família Pimelodidae (Siluriformes). De acordo com Garavello (2005), existem 6 espécies válidas e todas distribuídas nas bacias hidrográficas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. São elas: *S. amblyurum* (Eigenmann & Eigenmann 1888), *S. doceanum* (Eigenmann & Eigenmann 1889), *S. meladermatum* (Garavello 2005), *S. parahybae* (Steindachner 1877), *S. punctatum* (Miranda Ribeiro 1918) e *S. scriptum* (Miranda Ribeiro 1918).

São espécies de grande porte e presentes em águas correntes sobre leitos rochosos (Garavello 2005) e apresentam características típicas como cabeça pequena e deprimida, além de pequenos olhos dorsais na região anterior da cabeça (Baldisserotto & Gomes 2013). As informações sobre a biologia reprodutiva desse gênero se limitam as duas espécies mais estudadas *S. scriptum* (rio Uruguai) e *S. meladermatum* (rio Iguaçu) (Zaniboni-Filho *et al.* 2010).

A espécie *Steindachneridion scriptum*

O *Steindachneridion scriptum* (Miranda Ribeiro 1918) é chamado popularmente de Suruvi ou Bocudo. É um bagre de coloração cinzenta-pardo-escura, com pequenas manchas pretas irregulares e vermiformes (Godoy 1987). Pode medir até 90 cm de comprimento e pesar 7 kg (Zaniboni-filho *et al.* 2004). Apresenta hábito alimentar piscívoro e intensa atividade durante o período noturno (Zaniboni-Filho & Schulz 2003).

É uma espécie nativa da bacia do alto rio Uruguai e do alto rio Paraná (Garavello 2005), sendo geralmente encontrada em locais profundos que intercorrem corredeiras em rios de porte médio e grande (Agostinho *et al.* 2008). Segundo a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção do ICMbio de 2014, o *S. scriptum* caracteriza-se em perigo de

extinção baseada em sua distribuição severamente fragmentada, barramentos ao longo de sua área de distribuição, além do declínio da área de ocupação e qualidade de habitat.

É reofílico, apresenta fecundação externa (Britto *et al.* 2008) sem cuidado parental, além de curto período reprodutivo compreendendo os meses de outubro e novembro (Reynalte-Tataje & Zaniboni-Filho 2008). Apresenta desova total, assim como outros bagres que migram. De acordo com Meurer & Zaniboni Filho (2000), os oócitos são liberados com diâmetro médio de 1,43 mm e fecundidade relativa média de 16.090 oócitos/kg de peixe. Apresenta maiores tamanhos quando comparados a outros Pimelodídeos e uma menor fecundidade, característica típica de peixes com estratégias de migrações reprodutivas limitadas.

Segundo Agostinho (2008), a espécie apresenta 42,0 cm para os machos e 48,0 cm para as fêmeas na primeira maturação. Estipula-se que os machos presentes no rio Paraná atingem a primeira maturação gonadal com 820 g e as fêmeas com 1.220 g (Agostinho *et al.* 2008). O sêmen de Suruvi após indução hormonal é liberado facilmente através de massagem abdominal, além de serem animais considerados dóceis para manejo. Entretanto, ainda existem poucos estudos relacionados a espécie (Maguelly *et al.* 2014).

Possui importância destacada na pesca nas regiões de ocorrência, uma vez que representa a quarta espécie mais capturada em termos de biomassa na área de abrangência das Usinas Hidrelétrica de Itá (Beux & Zamiboni Filho 2008) e Machadinho (Schork *et al.* 2012). Além da espécie apresentar importantes funções de controle e estabilização na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos do qual faz parte.

Banco de germoplasma

Nas últimas duas décadas, tem aumentado a preocupação com a biodiversidade brasileira, visto que, representa cerca de 14% do total das espécies do mundo (Lewinshohn & Prado 2005). Através de ações não governamentais, governamentais e pela criação da legislação ambiental, foram criadas inúmeras áreas de proteção ambiental atraindo a atenção para a necessidade de conservação da vida silvestre.

A constante perda e degradação dos habitats, tem constituído uma importante ameaça para as espécies continentais. Segundo o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (2014), a expansão agrícola e urbana assim como a instalação de

grandes empreendimentos (portos, hidrelétricas e mineração) resultaram em diversas espécies em risco no Brasil.

Em 2014 as Listas de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção vigentes contaram com 1.173 espécies, elaboradas com base no processo de avaliação de risco de extinção da fauna brasileira (ICMbio 2014). Por isso, é de extrema necessidade a conservação desses ecossistemas, além das espécies habitantes. Entre os animais listados está o Suruvi, *Steindachneridion scriptum*, classificado como em perigo de extinção devido à perda e degradação do seu habitat.

Devido a essa intensa deterioração ambiental estar levando ao declínio e extinção de inúmeras espécies (Purvis *et al.* 2000; Primack & Rodrigues 2001), se torna necessário medidas que evitem seu agravamento e possibilitem sua conservação. Entre as estratégias adotadas, temos a conservação *in situ* baseada na manutenção do organismo em seu habitat natural. É através dela, que novas espécies vão ser descobertas e desenvolvidas estratégias de conservação eficientes (Primack & Rodrigues 2001). No entanto, quando as populações encontram-se reduzidas ou quando os indivíduos estão fora das áreas protegidas esse método mostra-se ineficaz (Costa & Martins 2008).

Portanto, é preciso utilizar estratégias como a conservação *ex situ*, na qual permite que o recurso genético seja preservado fora de seu habitat, através de bancos de germoplasma. A utilização desses bancos tem como objetivo recuperar populações extintas ou em risco (Silva *et al.* 2012), sendo sua principal biotécnica a criopreservação de sêmen (Costa & Martins 2008).

Porém, quando atuam juntos esses dois métodos, *in situ* e *ex situ*, tornam-se complementares e capazes de se aliar a programas de reintrodução de indivíduos oriundos da populações *ex situ* e serem liberados no seu habitat, ajudando assim a conservação *in situ* (Nijman 2006).

Criopreservação de sêmen

Atualmente no Brasil, mais de 17 espécies de peixes de água doce têm seu protocolo de criopreservação de sêmen estabelecido, especialmente as famílias Anostomidae, Characidae, Pimelodidae e Pronchilodontidae (Caresfeld *et al.* 2003; Maria *et al.* 2009; Viveiros & Godinho 2009; Viveiros 2011, Araújo 2011). Onde a criopreservação do

germoplasma dos organismos aquáticos possibilita a preservação do genoma de espécies ameaçadas de extinção, além de evitar perdas de diversidade genética ocasionadas por doenças e catástrofes (Ballou 1992; Hagedorn *et al.* 2012).

A criopreservação de sêmen permite a conservação do material genético em nitrogênio líquido a -196° C. Nessa temperatura a estrutura e funcionalidade das células são preservadas, sendo geneticamente viáveis e inativas metabolicamente (Pegg 2007).

Segundo Maria & Carneiro (2012), as etapas da criopreservação de sêmen incluem: coleta do material biológico, avaliação microscópica da qualidade seminal, adição de diluidores e crioprotetores, envase, congelamento, armazenamento e descongelamento.

Devido ao grande número de espécies com fecundação externa é necessário atenção durante a coleta de sêmen. Já que neste caso, os espermatozoides encontram-se imóveis nos testículos (meio isotônico) e o contato com diferenças osmóticas, como a água, acabam desencadeando sua ativação. Isto, ocorre devido a troca de íons entre a solução e seus espermatozoides. Dessa forma, no momento da coleta deve-se evitar o contato com fezes, urina e sangue, impedindo assim, a ativação da motilidade espermática (Maria & Carneiro 2012).

Outro problema durante o congelamento são as crioinjúrias, que são ocasionadas pelos cristais de gelo devido ao congelamento da água intra e extracelular, podendo estas, romperem estruturas celulares, como a membrana plasmática (Bianchi *et al.* 2008; Varela Junior *et al.* 2012). Assim, a fim de minimizar estes problemas o sêmen é adicionado em meio contendo diluidor com crioprotetor, evitando tanto a ativação espermática quanto proteção contra as baixas temperaturas (Maria & Carneiro 2009).

A partir da criopreservação é possível a formação dos bancos de germoplasma, garantindo a diversidade, preservação e reposição de espécies que se encontram suscetíveis a extinção. Além de inúmeros outros benefícios como: fornecer sêmen de boa qualidade para a fertilização artificial (Varela *et al.* 2012), aumentar a produção larval (Kopeika & Kopeika 2008) e evitar problemas como a assincronia na maturidade gonadal (Maria *et al.* 2009).

Diluidores e crioprotetores

Apesar das diferenças espermáticas entre os peixes, para bons resultados dois componentes são necessários na solução, são eles: o diluente que fornece os nutrientes necessários para a manutenção celular e o crioprotetor que minimiza os efeitos do congelamento (Maria & Carneiro 2009; Salmito-Vanderley *et al.* 2012).

Os diluidores são soluções de sais ou carboidratos que auxiliam na preservação durante o resfriamento e no congelamento. Necessita ser isotônico, para que não ocorra a ativação espermática e ser estável e estéril ao longo do seu armazenamento (Maria 2005).

Em seu trabalho Viveiros & Godinho (2009) citam a solução salina com 0,9% de NaCl, a solução de glicose 5% e *Betsville Thawing Solution* (BTS) como bons diluidores para sêmen de peixe. Este último, o BTS, inicialmente utilizado no descongelamento de sêmen de suínos (Pursel & Johnson 1975), apresenta bons resultados na criopreservação de sêmen de peixe (Varela Junior *et al.* 2012). Onde sua composição básica é constituída por glicose para o fornecimento de energia, bicarbonato para controlar o pH, além de pequenas quantidades de potássio e etilenodiamino-acético (EDTA) (Johnson *et al.* 2000).

Outra função importante do diluidor é servir como carreador do crioprotetor. Em que, os crioprotetores tem como finalidade evitar a formação de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico e reduzir o ponto de congelamento da água na célula (Medeiros *et al.* 2002; Soares & Guerra 2009). Eles necessitam possuir baixa toxicidade e alta solubilidade em água, e são classificados em dois grupos: permeáveis e não-permeáveis (Maria 2005).

Os crioprotetores permeáveis, são substâncias químicas de baixo peso molecular e alta solubilidade em água (Nash 1966), tornando possível penetrar nas células e proteger suas organelas, especialmente a membrana plasmática (Cabrita *et al.* 2009). Podemos citar: metanol, etilenoglicol e glicerol como bons para a criopreservação de sêmen de peixes. Assim como, o metilglicol que tem apresentado bons resultados (Maria *et al.* 2006 b; Viveiros *et al.* 2009; Nascimento *et al.* 2010) e o dimetilsulfóxido (DMSO) sendo o mais utilizado em peixes nativos brasileiros (Varela *et al.* 2012).

Já os crioprotetores não-permeáveis, apresentam alto peso molecular (Zhang *et al.* 2007), normalmente não penetram a membrana durante um curto intervalo de exposição, e são responsáveis por reduzir a formação de gelo devido a promover a desidratação da célula protegendo membrana celular (Niemann 1991; Denniston *et al.* 2000). São representados

pelos açúcares complexos, como a trealose e outros di e trissacarídeos; lipoproteínas de baixa densidade (Varela *et al.* 2009), proteína do leite (Ammann & Pickett 1987; Viveiros & Godinho 2009), além da gema de ovo que pode ser adicionada em concentrações entre 5% a 10% (Maria *et al.* 2006 a; Viveiros & Godinho 2009).

Na família Pimelodidae, ordem Siluriformes, as soluções crioprotetoras mais usadas incluem metanol ou DMSO como representantes de crioprotetores permeáveis e lactose e leite em pó como crioprotetores não permeáveis (Carosfeld *et al.* 2003; Araújo 2011). Já para os Characiformes, os crioprotetores permeáveis mais utilizados são DMSO ou metilglicol e como não-permeável a gema de ovo (Salmito-Vanderley *et al.* 2014).

Dessa forma, proteção do espermatozoide durante tanto o congelamento quanto o descongelamento pode ser afetada pela composição da solução crioprotetora, pois cada espécie apresenta um protocolo específico (Maria *et al.* 2012; Salmito-Vanderley *et al.* 2014) devido as diferenças espermáticas entre elas. Fatores como: taxa de diluição, tempo de contato entre os componentes antes do congelamento, tempo e temperatura do descongelamento entre outros podem afetar a eficiência do protocolo (Tsai & Lin 2009).

Avaliação da motilidade espermática

O esperma dos peixes é constituído pelos espermatozoides diluídos em plasma, onde na maioria das espécies encontram-se imóveis e inativos. Já no momento da reprodução a motilidade é estimulada após a liberação dos espermatozoides (resultando em sua dispersão/diluição) do trato genital do macho e sua ativação ocorrendo devido a diferença osmótica do meio externo (Cosson 2004).

A motilidade espermática total representa a taxa de espermatozoides móveis, sendo o parâmetro mais utilizado para avaliar a qualidade espermática entre as espécies (Alavi *et al.* 2008). Seus resultados revelam a aptidão do organismo para a fertilização. E sua avaliação pode ser feita através de microscópio óptico por um técnico treinado, onde seu resultado expressa a porcentagem de espermatozoides móveis (Maria *et al.* 2006 a; Viveiros *et al.* 2009).

Outra forma de avaliação é através do Sistema de análise espermática computadorizada (CASA), que é utilizado para avaliar a motilidade dos espermatozoides criopreservados. Este equipamento, foi utilizado pela primeira vez em 1979, para avaliar as

células espermáticas de mamíferos (Dott & Foster 1979) e recentemente foi desenvolvido um *software* CASA de código aberto (Wilson-Leedy & Ingermann 2007). Este *software* é utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides. Essa ferramenta têm sido utilizada na criopreservação seminal de peixes para avaliar os efeitos de diferentes crioprotetores (Rurangwa *et al.* 2001; Liu *et al.* 2007; Beirão *et al.* 2008).

A partir das imagens reveladas por esse sistema, podemos observar as propriedades tanto de trajetória quanto velocidade dessas células, analisando inúmeros parâmetros sobre sua movimentação após o descongelamento. Segundo Verstegen *et al.* (2002), os parâmetros avaliados são:

Velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$): é a velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade.

Velocidade linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$): é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide. É sempre a mais baixa das três velocidades.

Velocidade média da trajetória (VAP - $\mu\text{m/s}$): é a velocidade da trajetória média do espermatozoide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real.

Frequência de batimento flagelar cruzado (BCFHz): é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. A BCF pode ser subestimada se existirem mais batimentos/segundo que imagens/segundo.

Retilinearidade (STR - %): é a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Linearidade (LIN - %): é a relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade.

Os valores de velocidade são determinados como percurso relevante percorrido em um período de tempo e são representados em $\mu\text{m/s}$, enquanto os valores de LIN, e STR são determinados como raio dos valores de velocidade (Amann & Katz 2004).

Nascimento *et al.* 2010 e Viveiros *et al.* 2010, concluem não existir diferença significativa entres os resultados obtidos da motilidade espermática através de avaliação subjetiva, por um técnico treinado ou utilizando o CASA, possibilitando assim bons resultados independente do método utilizado durante a execução do trabalho.

Avaliação das funções espermáticas

A avaliação da funcionalidade de organelas ou compartimentos dos espermatozoides após a criopreservação pode ser realizada através do uso de sondas (corantes fluorescentes), capazes de identificar alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula (Souza *et al.* 2013) devido a sua capacidade de se ligar a regiões específicas. Possibilitando avaliar a atividade mitocondrial (Ogier De Baulny *et al.* 1997; Trigo *et al.* 2015), o conteúdo de ATP (Ogier De Baulny *et al.* 1999), a funcionalidade mitocondrial (Liu *et al.* 2007; Liu *et al.* 2014), a fragmentação de DNA (Jenkins *et al.* 2014) e a integridade de membrana (Torres & Tiersch 2016), entre outros.

As funcionalidades podem ser analisadas através de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo. A epifluorescência executa a avaliação de 200 células espermáticas por lâmina, classificando de acordo com a fluorescência emitida.

Por outro lado, existe a citometria de fluxo para avaliação das características celulares, na qual permite avaliar, analisar e classificar as células diluídas em uma solução fisiológica. Esta solução, é direcionada a um fluxo linear, permitindo a passagem individual das células pelo feixe de luz ou laser (Bergtein *et al.* 2014). Esse feixe excita as sondas associadas as células e capta a frequência de luz, que é convertida em sinais elétricos que serão quantificados por *softwares* específicos (Bergtein *et al.* 2014). A combinação de várias sondas fluorescentes na análise de uma amostra, resulta em diversas subpopulações, correspondendo aos diferentes níveis de funcionalidade das células, visto que, são identificadas com base na fluorescência emitida.

Embora ambas as técnicas sejam eficientes, a microscopia de epifluorescência normalmente permite avaliar no máximo 200 células por análise. Já com a citometria de

fluxo, normalmente são analisados 10.000 células (eventos espermáticos) em menos de um minuto, permitindo maior rapidez e exatidão nos resultados (Soares & Guerra 2009).

Referências bibliográficas

Agostinho A.A., Zaniboni Filho E., Shibatta O., Garavello, J. (2008) *Steindachneridion scripta*. In: Machado A.B.M., Drummond G.M., Paglia A. P. (Eds.). Livro Vermelho Da Fauna Brasileira Ameaçada De Extinção. Brasília, Mma, 2, 239-240.

Alavi S.M.H., Linhart O., Coward K., Rodina M. (2008) Fish spermatology: implications for aquaculture management. In: Fish Spermatology, Alavi S.M.H., Cosson J.J., Coward K., Rafiee G. (Eds.) Alpha Science International Ltd, Oxford pp. 397–460.

Amann R.P. & Katz D.F. (2004) Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 25, 317-325.

Amann R.P. & Pickett B.W. (1987) Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 145-174.

Araújo R.V. (2011) Motilidade, Velocidade e Fertilidade do sêmen de Surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores. 91p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Lavras, MG.

Baldisseroto B. & Gomes L.C. (2013) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Ed. Da UFSM 364 pp.

Ballou J.D. (1992) Potencial contribution of cryopreserved germplasm of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* 29, 19-25.

Beirão J., Cabrita E., Pérez-Cerezales S., Martínez-Páramo S., Herráez M.P. (2008) Evaluation of cryopreservation protocols for gilthead seabream (*Sparus aurata*) sperm

based in the characterization of sperm subpopulations. in: Aquaculture Europe 08. Eds: Krakow, Poland.

Bergstein T.G., Weiss R.R., Bicudo S.D. (2014) Técnicas de análise de sêmen. Revista Brasileira de Reprodução Animal 38, 189-194.

Beux L.F. & Zaniboni Filho E. (2008) Produção pesqueira do reservatório de Itá Alto Uruguai. In: Zaniboni Filho E. & Nuner A.P.O.(Eds.) Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologia de cultivo e conservação da ictiofauna. Florianópolis. 87-108.

Bianchi I., Calderam K., Maschio E.F., Madeira E.M., Ulguim R., Corcini C.D., Bongalardo D.C., Corrêa E.K., Lucia Jr T., Deschamps J.C., Corrêa M.N. (2008) Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. Theriogenology 69, 632- 8.

Britto S.G.C., Sirol R.N., Vianna N.C., Jardim M.S., Santos J.C. dos., Pelisari J.C. (2008) Peixes do rio Paranapanema. São Paulo. Ed. Horizonte 87 pp.

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

Carolsfeld J., Harvey B., Godinho H.P., Zaniboni-filho E. (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. Journal Fish Biology 63, 472-481.

Cosson J. (2004) The ionic and osmotic factors controlling motility of fish permatzoa. Aquaculture International 12, 69-85.

Costa P.M. & Martins C.F. (2008) Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília 6, 39-55.

Denniston R.S., Michelet S., Godke, R.A. (2000) Principles of cryopreservation. In: Cryopreservation in aquatic species. Tiersch T.R., Mazik P.M. (Eds.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 59-74.

Dott M.H. & Foster G.C.A. (1979) Estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal of reproduction and fertility* 55, 161-166.

Eigenmann C.H. & Eigenmann R.S. (1888) Preliminary notes on South American Nematognathi, I. *Proceedings California Academy of Sciences* 1, 119-172.

Eigenmann C.H. & Eigenmann R.S. (1889) A revision of the South American Nematognathi or cat-fishes. *Occasional Papers of California Academy of Sciences* 1, 1-508.

Eigenmann C.H. & Eigenmann R.S. (1919) *Steindachneridion*. *Science (new series)* 50, 525-526.

Garavello, J. (2005) Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* 3, 607-623.

Godoy M.P. (1987) Peixes do estado de Santa Catarina. EDUFSC/ ELETROSUL/ FURB. Florianópolis, SC. 572 pp.

Hagedorn M., Van Oppen M.J., Carter V., Henley M., Abrego D., Puill-Stephan E., Negri A., Heyward A., MacFarlane D., Spindler R. (2012) First frozen repositior for the Great Barrier Reef coral created. *Cryobiology* 65, 157-158.

ICMBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2014) Lista de espécies ameaçadas. *Diário Oficial da União* 245,127.

Jenkins J.A., Olivier H.M., Draugelis-Dale R.O., Eilts B.E., Torres L., Patiño R., Nilsen E., Goodbred S.L. (2014) Assessing reproductive and endocrine parameters in male largescale

suckers (*Catostomus macrocheilus*) along a contaminant gradient in the lower Columbia River, USA. *Science of the Total Environment* 484, 365-378.

Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C. (2000) Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62, 143-172.

Kopeika E. & Kopeika J. (2008) Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.) *Fish spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford. 347-396.

Lewinsohn T.M. & Prado P.I. (2005) "How Many Species Are There in Brazil?" in *Conservation Biology* 19, 619-624.

Liu O., Wang X., Wang W., Zhang X., Xu S., Ma D., Xiao Z., Xiao Y., Li J. (2014) Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiology and Biochemistry* DOI 10.1007/s10695-014-9993-9

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

Maghelly O.R., Huergo G.M., Zaniboni-Filho E., Enke D.B.S. (2014) Características morfométricas e rendimento corporal do Suruvi *Steindachneridion scriptum* agrupados por sexo. *Boletim do Instituto de Pesca* 40, 419-430.

Maria A.N. (2005) Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 84 pp.

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

Maria, A. N., Viveiros A.T.M., Orfão L.H., Oliveira A.V., Morães G.F. (2006 b) Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyianus* (Characiformes, Characidae). *Animal Reproduction* 3, 55-60.

Maria A.N., Azevedo H.C., Carneiro P.C.F. (2009) Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, M.. (Org.). *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá 1, 47-63.

Maria A.N., Azevedo H.C., Carneiro P.C.F. (2012) Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil estado da arte e perspectivas futuras. *Ciência Animal* 22, 124-131.

Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L. (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.

Meurer S. & Zaniboni Filho E. (2000) O suruvi *Steindachneridion scripta* (Ribeiro, 1918), como espécie alternativa para a piscicultura sul brasileira. Florianópolis, *Anais do XI Simpósio Brasileiro de Aquicultura* 1-7 pp.

Miranda Ribeiro A. (1918) Três Gêneros e Dezessete Espécies Novas de Peixes Brasileiros. *Revista do Museu Paulista* 10, 629-646.

Nash T. (1966) Chemical constitution and physical properties of compound able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: Meryman H.T. (Eds.). *Cryobiology* 179-220.

Nascimento A.F., Maria A.N., Pessoa N.O., Carvalho M.A., Viveiros A.T.M. (2010) Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science* 118, 324-329.

Niemann H. (1991) Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 35, 109-124.

Nijman V. (2006) *In-Situ* and *Ex-Situ* status of the Javan Gibbon and the role of zoos in conservation of the species. *Contribution to Zoology* 75, 3-4.

Ogier De Baulny B., Le Bern Y., Kerboeuf D., Maise G. (1997) Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 34, 141-149.

Ogier De Baulny B., Labbe C., Maise G. (1999) Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 39, 177-184.

Pegg D.E. (2007) Principles of Cryopreservation. In: Day J.G., Stacey G.N. (Eds.). *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 368, 39-58.

Primack R. B. & Rodrigues E. (2001) *Biologia da conservação*. Londrina: Planta, 327 pp.

Pursel V.G. & Johnson L.A. (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* 40, 99-102.

Purvis, A., Gittleman J.L., Cowlishaw G., Mace G.M. (2000) Predicting extinction risk in declining species. *Proceedings of The Royal Society Biological Sciences* 267, 1947-1952.

Reynalte-Tataje D. & Zaniboni-Filho E. (2008) *Biologia e identificação de ovos e larvas de peixes do alto rio Uruguai*. In: Zaniboni-Filho E. & Nuner A.P.O.(Eds.). *Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna*. Florianópolis: Ed. Da UFSC, 229-256 pp.

Rurangwa E., Volckaert F.A.M., Huyskens, G., Kime D.E., Ollevier F. (2001) Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis

(CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* 55, 751-769.

Salmito-Vanderley C.S.B., Vieira M.J.A.F., Leite L.V., Oliveira F.C.E., Linhares F.R.A., Salgueiro C.C.M., Nunes J.F. (2012). Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal* 22, 255-268.

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

Schork G., Hermes-Silva S., Beux L.F., Zaniboni-Filho E., Nuner A.P.O. (2012) Diagnóstico da pesca artesanal na Usina Hidrelétrica de Machadinho, Alto Rio Uruguai – Brasil. *Boletim Instituto de Pesca* 38, 97-108.

Silva A.R., Souza A.L.P., Santos E.A.A., Lima G.L., Peixoto G.C.X., Souza P.C., Castelo T.S. (2012) Formação de Bancos de Germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. *Ciência Animal* 22, 219-234.

Soares A.T. & Guerra M.M.P. (2009) Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária* 3, 53-63.

Sousa D.B., Bicudo S.D., Azevedo H.C., Maia M.S. (2013) Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. *Veterinária e Zootecnia* 20, 649-657.

Steindachner F. (1877) Die Süßwasserfische des südöstlichen Brasilien (III). *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe* 74, 559-694.

Torres L. & Tiersch T.R. (2016) Amine reactive dyes: An alternative to estimate membrane integrity in fish sperm cells *Aquaculture* 463, 71-78.

Trigo P., Merino O., Figueroa E., Valdebenito I., Sanchez R., Risopatron, J. (2015) Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *Andrologia* 47, 407-411.

Tsai S. & Lin C. (2009) Effect of cryoprotectant on the embryos of banded coral shrimp (*Stenopus hispidus*): preliminary studies to establish freezing protocols. *CryoLetters* 30, 373-381.

Varela Junior A.S., Corcini C.D., Ulguim R.R., Alvarenga M.V.F., Bianchini I., Corrêa M.N., Lucia Jr T., Deschamps J.C. (2009) Effect of low-density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science* 115, 323-327.

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

Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. (2002) Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.

Viveiros A.T.M. (2011) Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. T. R. Tiersch and C. C. Green, (Eds.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 387-397 pp.

Viveiros A.T.M. & Godinho H.P. (2009) Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 137-150.

Viveiros A.T.M., Orfão L.H., Maria A.L., Allaman I.B. (2009) Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science* 112, 293-300.

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

Wilson-Leedy J.G. & Ingermann R.L. (2007) Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661-672.

Zaniboni-Filho E. & Schulz U.H. (2003) Migratory Fishes of the Uruguay River. In: Carolsfeld, J. et al. (Eds.). *Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status*. Victoria: World Fisheries Trust/The World Bank/International Development Research Centre, 135-168 pp.

Zaniboni-Filho E., Meurer S., Shibatta O.A., Nuñez A.P.O. (2004) *Catálogo ilustrado de peixes do Alto do Rio Uruguai*. Florianópolis, SC. 128 pp.

Zaniboni-Filho E., Reynalte-Tataje S.S., Hermes-Silva S. (2010) Cultivo de bagres do gênero *Steindachneridion*. 363-382 pp in Baldisseroto B., Gomes L.C. (Eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. UFSMS, Santa Maria.

Zhang T., Rawson D.M., Pekarsky I., Blais I., Lubzens E. (2007) Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. P.J. Barbin et al (Eds.). *The Fish Oocyte: From Basic to Biotechnological Applications*, Springer. 411-436.

CAPÍTULO 1

Dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol na criopreservação espermática do Suruvi, *Steindachneridion scriptum*.

“Manuscrito a ser submetido para a revista Aquaculture Research.”

22 **Resumo**

23

24 O objetivo deste estudo foi analisar o efeito dos álcoois dimetilsulfóxido
25 (DMSO), metanol e metilglicol nas concentrações de 5%, 7,5%, 10%, 12,5% e
26 15% na criopreservação espermática do *S. scriptum*. Os machos (n=15) foram
27 obtidos na Piscicultura Panamá (Paulo Lopes/SC) e tiveram seu esperma
28 coletado por massagem abdominal e diluído (1:9 v/v) em *Betsville Thawing*
29 *Solution* (BTS) para avaliação dos parâmetros espermáticos. As melhores
30 médias de motilidade total e progressiva, referem-se ao metilglicol em todas
31 concentrações e de metanol em 7,5 e 10% ($P < 0.05$), já o maior período de
32 motilidade ao DMSO 5; 7,5 e 15%, além do metanol 5% e metilglicol em 7,5;
33 10; 12,5 e 15% ($P < 0.05$). Além metilglicol em 7,5% ($P < 0.05$) se destacar nas
34 demais análises da cinética. Já produção de ROS diminuiu apenas com
35 metilglicol 5% comparado ao DMSO 5% ($P < 0.05$), porém a LPO e a
36 fragmentação do DNA não diferiram entre si ($P > 0.05$). O DMSO 5; 7,5 e 10%,
37 conferiram maior integridade celular comparado ao metilglicol 5% ($P < 0.05$).
38 No entanto, o metanol 12,5% possibilitou menor fluidez de membrana
39 comparado ao DMSO 12,5% ($P < 0.05$), porém sua funcionalidade foi superior
40 com DMSO 10 e 12,5% ($P < 0.05$) comparado ao metanol 10% e metilglicol 5%
41 ($P > 0.05$). Por fim, as maiores funcionalidades mitocondriais foram obtidas
42 com DMSO 12,5 e 15% diferenciando-se apenas do metilglicol 5% ($P < 0.05$).
43 O metilglicol 7,5% foi o tratamento mais eficiente na criopreservação
44 espermática do *S. scriptum*.

45

46 **Introdução**

47

48 O *Steindachneridion scpritum* (Miranda-Ribeiro 1918) é popularmente
49 conhecido como Suruvi, sendo encontrado no Rio Uruguai e Alto Rio Paraná
50 (Garavello 2005). Essa espécie realiza migração reprodutiva com fecundação
51 externa (Britto *et al.* 2008), além de desova total (Meurer & Zaniboni Filho
52 2000). Encontra-se em perigo de extinção devido à sua distribuição
53 fragmentada, ocorrência de barramentos ao longo de sua área de distribuição,
54 além do declínio da área de ocupação e qualidade de habitat (ICMBio 2014).
55 Dessa forma, se faz necessário a utilização de estratégias que possibilitem sua
56 preservação.

57 Entre as possibilidades de conservação, temos a *ex situ*, que é
58 considerada uma valiosa ferramenta de preservação. A partir dela, é possível a
59 criação de bancos de germoplasma que utilizam a biotécnica da
60 criopreservação. O uso da criopreservação permite a proteção dos recursos
61 genéticos e conservação de sua biologia (Figuroa *et al.* 2014) tornando-se
62 essencial para evitar o declínio de espécies em risco.

63 Entretanto, a criopreservação ocasiona danos devido ao choque térmico
64 (Wang *et al.* 1997; Bucak *et al.* 2008) e rápido restabelecimento do
65 metabolismo pela reidratação das células espermáticas (Holt 2000). Além de
66 durante o congelamento, ocorrerem as crioinjúrias causados pelos cristais de
67 gelo tanto internos quanto externos, que causam tanto lesões mecânicas às
68 organelas celulares (Cabrita *et al.* 2005) quanto a perda de motilidade
69 espermática (Chatterjee *et al.* 2001). A fim de minimizar esses danos, os

70 crioprotetores são adicionados em soluções diluidoras para a proteção dos
71 espermatozoides (Squires *et al.* 1999). Esses crioprotetores se dividem em
72 permeáveis, que apresentam baixo peso molecular e alta solubilidade em água
73 possibilitando sua rápida penetração e em não permeáveis, que apresentam
74 alto peso molecular e não penetram a célula protegendo-a externamente.

75 Dentre os vários crioprotetores permeáveis existentes podemos citar os
76 álcoois Dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e metilglicol que tem sido testados
77 em peixes de água doce brasileiros, com o intuito de reduzir as crioinjúrias
78 oriundas da criopreservação. O DMSO é considerado o crioprotetor mais eficaz
79 nas concentrações de 5 a 15% nas espécies nativas brasileiras (Viveiros &
80 Godinho 2009). Porém, estudos já realizados apresentam o metilglicol
81 favorecendo maiores motilidades pós-descongelamento quando comparado ao
82 DMSO nos espermatozoides das espécies testadas (*B. nattereri*, *B.*
83 *orbignyana*, *L. obtusidens* e *P. lineatus*). Já o metanol 10%, quando testado
84 em espécie nativa *P. corruscans* adicionado a leite em pó 15% foi eficaz na
85 criopreservação de suas células espermáticas (Carolsfeld *et al.* 2003).

86 Dessa forma, a escolha adequada dos crioprotetores se torna essencial
87 pois depende do modo de ação, concentração, temperatura e período de
88 exposição (Tsai & Lin 2009) apresentando toxicidade correlacionada as
89 características seminais de cada espécie, sendo o protocolo de congelamento
90 espécie-específico. Além disto, até o momento não encontramos na literatura
91 científica, uma forma ou protocolo de congelamento do esperma do *S.*
92 *scriptum*.

93 Visando o desenvolvimento de um protocolo de congelamento para o
94 material genético do Suruvi, o objetivo do trabalho foi analisar diferentes
95 concentrações (5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15%) de álcoois (DMSO, metanol e
96 metilglicol) na criopreservação espermática do *S. scriptum*.

97 **Materiais e métodos**

98

99 As coletas de espermáticas do *S. scriptum* juntamente com as análises
100 iniciais e o congelamento foram realizados na Piscicultura Panamá
101 (27°57'37.8"S e 48°45'29.0"W) em Paulo Lopes - SC - Brasil. Já o
102 descongelamento e as demais análises realizadas na Universidade Federal de
103 Pelotas - UFPEL em Pelotas - RS - Brasil e na Universidade Federal de Rio
104 Grande - FURG em Rio Grande - RS - Brasil. O trabalho foi realizado com
105 autorização da Comissão De Ética Em Uso Animal (CEUA) da Universidade
106 Federal de Rio Grande (Ata 005/2016).

107 **Coleta espermática**

108 Foram utilizados 15 machos selvagens (2,5 ± 2,0 kg) sexualmente
109 maduros, durante o período reprodutivo do *S. scriptum*. Todos foram induzidos
110 hormonalmente utilizando extrato de hipófise de carpa (0,5 mg/kg), na qual os
111 animais foram mantidos em tanques com água a 26°C. Após 12 horas, cada
112 animal foi retirado do tanque e seco com toalha de papel para a realização da
113 massagem abdominal. As alíquotas de sêmen coletado foram armazenados em
114 tubos cônicos de 15 mL e acondicionados refrigerados, ficando entre 5 e 8°C.

115 As amostras utilizadas não foram contaminadas por água, fezes, sangue ou
116 urina.

117 Avaliação espermática *in natura*

118 Foi realizada através de microscópio óptico de contraste em 400x (BX
119 Olympus 41) sendo a ativação espermática realizada com 1µL de amostra e
120 4µL de solução de ativação (Carneiro *et al.* 2012) em lâmina sob lamínula.

121 Criopreservação

122 Cada amostra de espermatozóide foi exposta a todos os tratamentos do
123 experimento. Onde o diluente base utilizado foi o *Beltsville Thawing Solution*
124 (BTS), constituído por 37 g de glicose, 6 g de citrato de sódio, 1,25 g de
125 bicarbonato de sódio, 1,25 g de EDTA e 0,8 g de cloreto de potássio, 0,7 g
126 estreptomicina para 1L de água destilada (Pursel & Johnson 1975), além da
127 adição dos crioprotetores permeáveis dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MET)
128 e metilglicol (MG) nas concentrações de 5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15%. Todos
129 os produtos químicos utilizados para a realização do trabalho foram da SIGMA
130 CHEMICAL COMPANY® (ST. LOUIS, MO, EUA).

131 Após a diluição as amostras foram homogeneizadas e envasadas em
132 palhetas de 250µl, fechadas com álcool polivinílico e colocadas em racks de
133 alumínio, permanecendo por 20 minutos à 20°C para maior contato entre os
134 componentes. Logo após foram colocadas em botijão *dry shipper* de vapor de
135 nitrogênio (Taylor-Wharton, modelo CP 300 dry shipper), por 12 horas, e
136 transferidas para botijão de nitrogênio líquido (MVE™, VOLTA 34, GA, USA) à -
137 196°C, ficando armazenadas por no mínimo 30 dias (Varela Junior *et al.* 2012).

138 Descongelamento

139 As amostras foram descongeladas em banho-maria a 45°C por 8
140 segundos e colocadas em microtubos de 1,5 mL (Streit Jr DP *et al.* 2006).

141 Sistema de análise espermática computadorizada (CASA)

142 Análise de cinética espermática foi realizada através de sua ativação
143 utilizando 1 µL de amostra e 4 µL de solução de ativação (Carneiro *et al.* 2012),
144 sob lâmina e lamínula no equipamento Sistema de análise espermática
145 computadorizada (CASA) com software Sperm Vision® (Minitube). Seguido da
146 ativação foram capturados 10 campos entre 5 e 10 s iniciais, resultando no
147 mínimo de 1000 células. Os parâmetros avaliados foram motilidade total (%),
148 motilidade progressiva (%), distância média percorrida DAP (µm), distância
149 curvilínea DCL (µm), distância retilínea DSL (µm), velocidade média do
150 percurso VAP (µm/s), velocidade curvilínea VCL (µm/s), velocidade retilínea
151 VSL (µm/s), retilinearidade STR (VSL / VAP %), linearidade LIN (VSL / VCL %),
152 oscilação WOB, deslocamento lateral da cabeça ALH (µm), frequência de
153 batimento cruzado BCF (Hz) (Dziewulska *et al.* 2011). O tempo de motilidade
154 (TMot) foi considerado desde o momento da ativação dos espermatozoides até
155 o término do movimento progressivo (Varela Junior *et al.* 2015).

156 Citometria de fluxo

157 Para a citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento Attune Acoustic
158 Focusing® (Life Technologies), com os lasers azul (Argônio 488 nm) e violeta
159 (UV 405 nm). Apenas o último foi utilizado para as análises das seguintes
160 estruturas celulares: fragmentação de DNA, fluidez de membrana,

161 funcionalidade de membrana e mitocôndria, LPO, rompimento celular e ROS.
162 Os resultados foram obtidos através do *software* versão 2.1 (Life
163 Technologies). Para a detecção das populações espermáticas, exceto de
164 fragmentação de DNA, foi utilizado o corante Hoechst 33342 a 16.2 mM. Para
165 eliminar os eventos não espermáticos foi realizado gráficos de dispersão FSC x
166 SSC e Hoeschst 33342 negativo. A avaliação de todos os tratamentos foi a
167 partir de células coradas com fluoróforos adicionadas em PBS livre de cálcio
168 (0,2g de KCl, 0,2g de KH₂PO₄, 1,15g de Na₂HPO₄ e 8g de NaCl para 1L de
169 água deionizada, com pH 7,2), usando o total de 10.000 espermatozoides por
170 análise (excluído os debris).

171 Funcionalidade de membrana e rompimento celular

172 A funcionalidade de membrana, foi avaliada utilizando os fluoróforos
173 iodeto de propídio (PI) e Sybr14 (MINITÜBE, TIEFENBACH, GERMANY). A
174 alíquota de sêmen descongelado foi incubada durante 10 min na sonda
175 fluorescente contendo 0,25 µM de Sybr14 e 7,5 µM IP de acordo com as
176 instruções do fabricante - Minitube. Os espermatozoides foram classificados
177 como não lesados e com membrana funcional (Sybr + / IP-) e lesados e/ou com
178 membrana não funcional (Sybr + / IP +; Sybr- / IP +; Sybr- / IP-) (Figuroa *et al.*
179 2015). Já para verificar o percentual de rompimento celular, as células que
180 apresentaram IP - foram classificadas como não rompidas, as que
181 apresentaram IP + foram classificadas como rompidas.

182 Fluidez de membrana

183 A fluidez de membrana, foi verificada utilizando 2,7 μM corante
184 merocianina hidrofóbico 540 (M540) e 0,1 μM de YO PRO-1 (Invitrogen -
185 Eugene, OR, EUA) em 10 μL de amostra incubada durante 10 min. Sendo
186 avaliadas células de alta fluidez (alta concentração de M540) e baixa fluidez
187 (baixa concentração de M540), apenas para os espermatozoides íntegros (YO-
188 PRO negativo) (Fernández-Gago *et al.* 2013). A taxa de fluidez de membrana,
189 foi calculada através do número de espermatozoides com alta fluidez/ número
190 de espermatozoides com alta fluidez + espermatozoides com baixa fluidez
191 *100.

192 Funcionalidade de mitocôndria

193 A funcionalidade de mitocôndria, foi verificada com 3,1 μM de
194 Rhodamina 123 (fluorescência verde), e 7,5 μM de IP em 10 μL de amostra
195 descongelada após incubados durante 10 min. As células espermáticas foram
196 classificadas quanto à alta funcionalidade (alta fluorescência pela acumulação
197 de Rhodamina) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência, baixa acumulação
198 de Rhodamina), avaliando apenas os espermatozoides intactos (IP negativo)
199 (Liu *et al.* 2015). A taxa de funcionalidade de mitocôndria, foi calculada através
200 do número de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial/
201 número de espermatozoides alto potencial de membrana mitocondrial +
202 espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial *100.

203 Índice de fragmentação de DNA

204 A integridade de DNA, foi avaliada pelo ensaio da estrutura de cromatina
205 (SCSA). Para verificação desse parâmetro, 10µL de amostra contendo os
206 espermatozoides descongelados foi adicionado a 5µL de TNE (0.01 M Tris-HCl;
207 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10µL de Triton 1X (Triton X-100, 1%) (v /
208 v) com intervalos de 30 segundos. O corante acridine orange foi então
209 adicionado e incubado por 30 s não ultrapassando o tempo de 2 min, para
210 fazer a leitura. Sendo os espermatozoides que apresentavam DNA
211 fragmentado apresentando fluorescência vermelha e os que apresentavam
212 DNA íntegro apresentando fluorescência verde. (Evenson & Jost, 2001). A taxa
213 de fragmentação de DNA index (DFI%, %), foi calculada através da
214 fluorescência vermelha / intensidade de fluorescência total (vermelho + verde).

215 Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

216 A avaliação de concentração de ROS, foi realizada através de 1.0 µM do
217 fluoróforo 2'7' diclorofluoresceínadiacetato (H₂DCFDA) (emite fluorescência
218 verde quando oxidado) e 7.5µM de IP em 10 µL de amostra descongelada
219 após incubados durante 10 min. Foi utilizada a intensidade mediana de
220 fluorescência verde apenas para espermatozoides intactos (IP-) (Domínguez-
221 Rebolledo *et al.* 2011).

222 Peroxidação lipídica (LPO)

223 A peroxidação lipídica dos espermatozoides foi avaliada imediatamente
224 após o descongelamento. Foi adicionada a concentração final de 1µM de
225 Bodipy C11 (Hagedorn *et al.* 2012) em 10 µL de amostra, e incubados por 2

226 horas a 20°C, sendo analisados apenas espermatozoides vivos. A taxa de
227 peroxidação lipídica foi calculada através da intensidade mediana de
228 fluorescência verde (lipídio peroxidado) / intensidade mediana de fluorescência
229 verde + intensidade mediana de fluorescência vermelha (lipídio não
230 peroxidado) *100.

231 Análise estatística

232 Todas as variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste
233 Shapiro-Wilk, seguidas por análise de variância (ANOVA) por teste de Tukey.
234 Os diferentes crioprotetores e suas concentrações foram considerados
235 variáveis independentes, já os parâmetros: motilidade total, motilidade
236 progressiva, tempo de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN,
237 WOB, ALH, BCF, funcionalidade de membrana, funcionalidade de mitocôndria,
238 fluidez de membrana, índice de fragmentação de DNA, ROS, LPO e
239 rompimento celular foram considerados variáveis dependentes. Todas as
240 análises foram realizadas no software Statistix 2010.

241 **Resultados**

242

243 A motilidade espermática do sêmen fresco foi de $97,6 \pm 1,8$ % e o
244 período de motilidade de $78,4 \pm 4,2$ s.

245 As melhores médias, no sêmen descongelado, de motilidade total e
246 progressiva, referem-se aos tratamentos com metilglicol, em todas
247 concentrações (5; 7,5; 10; 12,5 e 15%), e de metanol em 7,5 e 10% ($P < 0.05$)
248 (Tabela 1). Já o maior período de motilidade do sêmen descongelado, ocorreu

249 nos tratamentos com DMSO 5; 7,5 e 15%, além do metanol 5% e metilglicol em
250 7,5; 10; 12,5 e 15% ($P < 0.05$) (Tabela 1).

251 O melhor tratamento entre as diferentes análises da cinética (motilidade
252 total, motilidade progressiva, tempo de motilidade, distância média percorrida,
253 distância curvilínea, distância retilínea, velocidade média do percurso,
254 velocidade curvilínea, velocidade retilínea, retilinearidade, linearidade,
255 oscilação, deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimento flagelar
256 cruzado) dos espermatozoides descongelados foi o metilglicol 7,5%,
257 responsável por conferir as melhores médias ($P < 0.05$) (Tabelas 1 e 2).

258 A produção de ROS diminuiu no tratamento metilglicol 5%, comparado
259 ao DMSO 5% ($P < 0.05$) (Tabela 3). No entanto, a peroxidação lipídica (LPO) e
260 o índice de fragmentação do DNA os tratamentos não diferiram entre si ($P >$
261 0.05) (Tabela 3).

262 O DMSO nas concentrações de 5; 7,5 e 10%, proporcionou melhor
263 proteção a integridade celular durante o descongelamento do espermatozoide
264 quando comparado ao tratamento com 5% metilglicol ($P < 0.05$) (Tabela 3).

265 O tratamento metanol 12,5% resultou em uma menor fluidez de
266 membrana citoplasmática comparado ao DMSO 12,5%, conservando sua
267 permeabilidade após o descongelamento das células espermáticas ($P < 0.05$)
268 (Tabela 3). Já, quando avaliado a funcionalidade membrana desses
269 espermatozoides o DMSO em 10 e 12,5% ($P < 0.05$) foi superior quando
270 comparados com o metanol 10% e metilglicol 5% ($P > 0.05$) (Tabela 3).

271 Por fim, as maiores funcionalidades mitocondriais foram observadas nos
272 tratamentos com DMSO 12,5 e 15%, se diferenciando apenas do metilglicol 5%
273 ($P < 0.05$) (Tabela 3).

274 **Discussão**

275

276 A motilidade espermática é o fator mais utilizado para avaliar a qualidade
277 espermática após o descongelamento (Maria *et al.* 2006). Ela é essencial para
278 garantir o sucesso reprodutivo (Cabrita *et al.* 2010), pois é responsável pela
279 propulsão dos espermatozoides a fim de fertilizar o oócito. Durante o
280 descongelamento das células espermáticas do Suruvi os resultados referentes
281 ao metilglicol 7,5% nos inúmeros parâmetros da movimentação espermática
282 conferem importantes dados, já que, este é o primeiro estudo sobre
283 criopreservação espermática em *S. scriptum*, espécie nativa brasileira.

284 Sendo o tempo de duração da motilidade outro fator fundamental para
285 garantir sua reprodução. Segundo Billard (1986), a duração da motilidade varia
286 normalmente entre 30 e 60 segundos para as espécies de água doce com
287 fertilização externa. Dessa forma, os valores encontrados tanto no esperma *in*
288 *natura* (78 segundos) quanto nas amostras descongeladas (entre 30 e 67
289 segundos) do Suruvi possibilitariam sua reprodução.

290 Já o uso do DMSO permitiu uma maior proteção as organelas
291 membranosas (funcionalidade de membrana, funcionalidade mitocondrial e
292 integridade celular) além de uma menor fluidez de membrana durante o
293 congelamento. Mesmo a temperatura sendo uma das principais causas da
294 desestabilização das proteínas e dos lipídios da membrana plasmática (Hazel

295 & William 1990), além de causar alterações em sua fluidez devido as
296 modificações de interações e distribuições desses componentes (Van Meer *et*
297 *al.* 2008), esse crioprotetor possibilitou a crioproteção a essas organelas.

298 Sabendo que o DMSO possui rápida penetração, devido seu baixo peso
299 molecular (Lovelock & Bishop 1959), reduzindo a formação dos cristais de gelo
300 (Thirumala *et al.* 2006) ele pode ter proporcionado um ambiente celular mais
301 estável durante o congelamento. Pois segundo Sojka *et al.* (1990) o DMSO
302 possui capacidade de interagir ou combinar com lipídeos, proteínas entre
303 outras, sem alterar irreversivelmente sua organização molecular (Sojka *et al.*
304 1990), permitindo assim, seu reestabelecimento pós-descongelamento.

305 Considerando que a criopreservação desencadeia o estresse oxidativo,
306 devido ao aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS)
307 (Thomson *et al.* 2009, Kim *et al.* 2010; Aitken *et al.* 2012) além de induzir a
308 peroxidação lipídica (LPO) (Shaliutina *et al.* 2013), na qual ambos são
309 responsáveis por reduzir a qualidade espermática (Aitken & Curry 2011; Aitken
310 *et al.* 2012), se torna essencial uma menor produção de ROS durante a
311 criopreservação para minimizar os danos celulares. O crioprotetor metilglicol
312 5% causou uma redução nas espécies reativas de oxigênio quando comparado
313 ao DMSO 5%, porém o estresse oxidativo não foi forte o suficiente para
314 aumentar estatisticamente a LPO não ocorrendo diferença entre os tratamentos
315 utilizados.

316 Sendo o metilglicol derivado do metanol (CH₃OH) e do óxido de eteno
317 (CH₂OCH₂) (Viveiros *et al.* 2009b), considerado um álcool relativamente não
318 tóxico (Takagi *et al.* 1993) e recentemente utilizado como crioprotetor seminal

319 de peixes (Maria *et al.* 2006). Além desse crioprotetor, conferir importantes
320 resultados sobre os principais parâmetros da cinética espermática (motilidade
321 total e motilidade progressiva) além de estar presente entre os melhores
322 tempos nos espermatozoides descongelados do Suruvi. Maria *et al.* 2006
323 também atribuem resultados superiores do metilglicol quando comparado ao
324 DMSO e metanol durante a avaliação da motilidade espermática no
325 descongelamento do Piracanjuba (Maria *et al.* 2006).

326 Segundo Viveiros *et al.* (2009a), o crioprotetor metilglicol apresenta
327 resultados semelhantes e, às vezes, melhores que o DMSO no sêmen de
328 espécies nativas. Assim, os resultados encontrados no descongelamento das
329 células espermáticas do Suruvi apresentam o mesmo padrão proposto pelo
330 Viveiros, na qual o metilglicol, por vezes, apresentou melhores resultados
331 quando comparado ao DMSO.

332 Por fim o metanol, em suas diferentes concentrações, não foi
333 satisfatório, possivelmente devido a sua ineficiência na desidratação e
334 hidratação ocasionadas durante o congelamento das células espermáticas do
335 Suruvi. Semelhante ao encontrado por Viveiros *et al.* 2014, onde o metanol foi
336 responsável por reduzir a qualidade espermática pós-descongelamento do
337 Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

338 Além disso, Viveiros & Godinho (2009) alertam que é possível a
339 composição do plasma seminal afetar a sensibilidade dos espermatozoides
340 frente a ação dos crioprotetores. Lembrando que, o protocolo de
341 criopreservação é espécie-específico e as concentrações utilizadas ou até
342 mesmo o diluente base podem ter comprometido sua eficácia.

343 Esse estudo revela que o metilglicol de 7,5 a 10% combinado ao BTS,
344 manteve a viabilidade celular e os melhores resultados sobre a cinética
345 espermática após o congelamento. Destacando-se como os tratamentos mais
346 eficientes para a criopreservação espermática da espécie, possibilitando a
347 formação do seu banco de germoplasma, já que encontra-se em perigo de
348 extinção. Além deste trabalho identificar a sensibilidade desses
349 espermatozoides ao metanol, indicando-se assim evitar seu uso.

350 Assim, concluímos que na criopreservação espermática do *S. scriptum* o
351 melhores resultados tanto na cinética quanto na preservação das organelas
352 espermáticas foram obtidos com o BTS adicionado de 7,5% de metilglicol.

353

354 **Agradecimentos**

355

356 Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de
357 Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil) pelas bolsas de pós
358 graduação atribuída a J. R. Pereira, F. A. Pereira, D. M. Pires. Assim como, as
359 bolsas de pesquisadores Antonio Sergio Varela Junior (307195/2015-7) e
360 Carine Dahl Corcini (306356/2014-7). Agradecemos também a Piscicultura
361 Panamá (Paulo Lopes, SC, Brasil), aos membros do grupo Reprodução Animal
362 Comparada (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil) pela
363 assistência durante esse trabalho.

364 **Referências**

365

366 Aitken R.J. & Curry B.J. (2011) Redox regulation of human sperm function: from
367 the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and
368 DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 367-381.
369

370 Aitken R.J., Jones K.T. & Robertson S.A. (2012) Reactive oxygen species and
371 sperm function – in sickness and in health. *Journal of Andrology* 33, 1096-1106.
372

373 Billard R. (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species,
374 *Reproduction Nutrition Development* 26, 877-920.
375

376 Britto S.G.C., Sirol R.N., Vianna N.C., Jardim M.S., Santos J.C. dos., Pelisari J.
377 C. (2008) *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo. Ed. Horizonte, 86 pp.
378

379 Bucak M.N., Ateşşahin A., Yüce A. (2008) Effect of anti-oxidants and oxidative
380 stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small*
381 *Ruminant Research* 75, 128-134.
382

383 Cabrita E., Robles V., Cuñado S., Wallace J.C., Sarasquete C., Herráez M.P.
384 (2005) Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after
385 cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology* 50, 273-284.
386

387 Cabrita E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-
388 Cerezales S., Herráez M.P. (2010) Cryopreservation of fish sperm:
389 applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 623-635.

390

391 Carneiro P.C.F., Azevedo H.C., Santos J.P., Maria A.N. (2012)
392 Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sêmen: extenders,
393 cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods, *CryoLetters* 33, 385-393.

394

395 Carolsfeld J., Harvey B., Godinho H.P., Zaniboni-filho E. (2003)
396 Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal Fish*
397 *Biology* 63, 472-481.

398

399 Chatterjee S., De Lamirande E., Gagnon C. (2001) Cryopreservation Alters
400 Membrane Sulfhydryl Status of Bull Spermatozoa: Protection by Oxidized
401 Glutathione. *Molecular Reproduction and Development* 60, 498-506.

402

403 Domínguez-Rebolledo A.E., Martínez-Pastor F., Bisbal A.F., Ros-Santaella J.L.,
404 García-Alvarez O., Maroto-Morales A., Soler A.J., Garde J.J., Fernández-Santos
405 M.R. (2011) Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to
406 increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual
407 male variability. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 393-403.

408

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

412

413 Evenson D. & Jost L. (2001) Sperm chromatin structure assay for fertility
414 assessment. In: Current Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons, Inc.
415

416 Fernández-Gago R., Domínguez J.C., Martínez-Pastor F. (2013) Seminal
417 plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry
418 study. *Theriogenology* 80, 400-410.
419

420 Figueroa E., Valdebenito I., Farias J.G. (2014) Review article: Technologies
421 used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa.
422 *Aquaculture Research* 1-15.
423

424 Figueroa E., Merino O., Risopatrón J., Isachenko V., Sánchez R., Effer B.,
425 Isachenko E., Farias J.G., Valdebenito I. (2015) Effect of seminal plasma on
426 Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83, 238-245.
427

428 Garavello J. (2005) Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes:
429 Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* 3, 607-623.

430 Hagedorn M., McCarthy M., Carter V.L., Meyers S.A. (2012) Oxidative stress in
431 zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *PLoS One* 7:e39397.
432 doi:10.1371/journal.pone.0039397
433

434 Hazel J.R. & Williams E.E. (1990) The role of alterations in membrane lipid
435 composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical
436 environment. *Progress in Lipidd Research* 29, 167-227.

437

438 Holt W.V. (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction*
439 *Science* 62, 3-22.

440

441 ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Lista de
442 espécies ameaçadas. Instituto Chico Mendes de Conservação da
443 Biodiversidade (2014) Lista de espécies ameaçadas. *Diário Oficial da União*
444 245,127.

445

446 Kim S.H., Yu D.H., Kim Y.J. (2010) Effects of cryopreservation on
447 phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA
448 integrity in canine sperm. *Theriogenology* 73, 282-292.

449

450 Liu Q., Wang X., Wang W., Zhang X., Xu S., Ma D., Xiao Z., Li J. (2015) Effect
451 of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and
452 mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation.
453 *Fish Physiology and Biochemistry* 41, 413-422.

454 Loverlock J.E. & Bishop M.W.H. (1959) Prevention of freezing damage to living
455 cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183, 1394-1395.

456

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

460

461 Meurer S. & Zaniboni Filho E. (2000) O suruvi *Steindachneridion scripta*
462 (Ribeiro, 1918), como espécie alternativa para a piscicultura sul brasileira.
463 Florianópolis, Anais do XI Simpósio Brasileiro de Aquicultura 1-7 pp.

464

465 Miranda Ribeiro A. (1918) Três Gêneros e Dezessete Espécies Novas de
466 Peixes Brasileiros. *Revista do Museu Paulista* 10, 629-646.

467

468 Pursel V.G. & Johnson L.A. (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing
469 capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of*
470 *Animal Science* 40, 99-102.

471

472 Shaliutina A., Hulak M., Gazo L., Linhartova P., Linhart O. (2013) Effect of
473 short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in
474 Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon
475 sperm. *Animal Reproduction Science* 139, 127-135.

476

477 Sojka E.J., Kimmick S.V.B., Carison G.P. (1990) Dimethyl sulfoxide update –
478 New applications and dosing methods. *American Association of Equine*
479 *Practitioners* 36, 683-690.

480

481 Squires E.L., Pickett B. W., Graham J. K., Vanderwall D. K., McCue P. M.,
482 Bruemmer J. E. (1999) Cooled and frozen stallion semen: animal reproduction
483 and biotechnology laboratory. Fort Collins, CO, Colorado States University, 90
484 pp.

485

486 STATISTIX® 10 Analytical Software. 2010.

487

488 Streit Jr D.P., Benites C., Moraes G.V., Ribeiro R.P., Sakaguti E.S., Caldieri
489 R.F. (2006) Semen pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cryopreserved with
490 diluents used for swine semen. *Ciência Animal Brasileira* 7, 289-297.

491

492 Takagi M., Boediono A., Saha S., Suzuki T. (1993) Survival rate of frozen-
493 thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various
494 cryoprotectants. *Cryobiology* 30, 306-312.

495

496 Thirumala S., Campbell W.T., Vicknair M.R., Tiersch T.R., Devireddy R.V.
497 (2006) Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving
498 sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology* 66, 964-973.

499

500 Thomson L.K., Fleming S.D., Aitken R.J., De Iuliis G.N., Zieschang J.A., Clark
501 A.M. (2009) Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is
502 predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human*
503 *Reproduction* 24, 2061-2070.

504

505 Tsai S. & Lin C. (2009) Effect of cryoprotectant on the embryos of banded coral
506 shrimp (*Stenopus hispidus*): preliminary studies to establish freezing protocols.
507 *CryoLetters* 30, 373-381.

508

509 Van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. (2008) Membrane lipids: where
510 they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 112-
511 124.

512

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

517

518 Varela Junior A.S., Goularte K.L., Alves J.P., Pereira F.A., Silva E.F., Cardoso
519 T.F., Jardim R.D., Streit DP Jr., Corcini C.D.(2015) Methods of
520 cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Animal*
521 *Reproduction Science* 157, 71–77.

522

523 Viveiros A.T.M., Godinho H.P. (2009) Sperm quality and cryopreservation of
524 Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*
525 35, 137-150.

526

527 Viveiros A.T.M., Orfao L.H., Maria A.N., Allaman I.B. (2009b) A simple,
528 inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus*
529 (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science* 112, 293-300.

530

531 Viveiros A.T.M., Oliveira A.N., Maria A.N., Orfão L.H., Souza J.C. (2009a)
532 Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different
533 cryoprotectant solutions. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E*
534 *Zootecnia* 61, 883-889.

535

536 Viveiros A.T.M., Nascimento A.F., Leal M.C., Gonçalves A.C.S., Orfão L.H.,
537 Cosson J. (2014) Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw
538 motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon*
539 *orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiology*
540 *and Biochemistry* 41, 193-201.

541 Wang A.W., Zhang H., Ikemoto I., Anderson D.J., Loughlin K.R. (1997) Reactive
542 oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49,
543 921-925.

Tabelas

Tabela 1: Análises da motilidade total, motilidade progressiva, tempo de motilidade, distância média percorrida, distância curvilínea, distância retilínea, velocidade média do percurso de espermatozoides descongelados do *Steindachneridion scprutum* (Miranda-Ribeiro 1918) com os álcoois dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol em diferentes concentrações (média ± erro padrão).

Análises de cinética espermática							
Tratamentos (%)	MotTot(%)	MotProg (%)	TMot (s)	DAP (µm)	DCL (%)	DSL	VAP (µm/s)
DMSO 5	29,7 ± 1,12 ^{bcd}	22,4 ± 1,07 ^{bcde}	67,8 ± 2,65 ^a	13,4 ± 0,33 ^{bcd}	16,5 ± 0,34 ^{cde}	11,0 ± 0,32 ^{bcde}	29,7 ± 0,73 ^{bcd}
DMSO 7,5	28,7 ± 1,33 ^{cd}	21,6 ± 1,21 ^{de}	55,1 ± 2,81 ^{abcd}	13,2 ± 0,38 ^{cde}	16,4 ± 0,43 ^{cdef}	10,9 ± 0,36 ^{cdef}	29,2 ± 0,84 ^{bcde}
DMSO 10	31,1 ± 1,54 ^{bcd}	23,2 ± 1,47 ^{cde}	49,1 ± 3,73 ^{bcde}	12,1 ± 0,30 ^{de}	15,0 ± 0,34 ^{defg}	9,8 ± 0,28 ^{def}	26,5 ± 0,70 ^{de}
DMSO 12,5	24,4 ± 1,25 ^{de}	17,5 ± 1,05 ^{ef}	45,4 ± 2,88 ^{def}	12,2 ± 0,26 ^{cde}	14,9 ± 0,32 ^{defg}	10,1 ± 0,24 ^{cdef}	26,8 ± 0,63 ^{cde}
DMSO 15	22,2 ± 1,33 ^e	15,6 ± 1,20 ^f	52,4 ± 3,00 ^{abcd}	12,0 ± 0,25 ^{de}	14,6 ± 0,28 ^{efg}	9,8 ± 0,23 ^{def}	26,8 ± 0,55 ^{cde}
MET 5	32,3 ± 1,65 ^{bcd}	23,7 ± 1,45 ^{cde}	59,5 ± 2,58 ^{abcd}	13,4 ± 0,33 ^{bcd}	16,8 ± 0,39 ^{bc}	11,1 ± 0,31 ^{bcd}	29,6 ± 0,75 ^{bcd}
MET 7,5	39,0 ± 2,08 ^{abc}	31,1 ± 1,97 ^{abcd}	49,1 ± 3,44 ^{cde}	14,3 ± 0,48 ^{bc}	18,0 ± 0,57 ^{bc}	12,0 ± 0,46 ^{bc}	31,5 ± 1,09 ^{bc}
MET 10	42,1 ± 2,15 ^{ab}	31,7 ± 2,03 ^{abcd}	48,1 ± 3,48 ^{cde}	13,8 ± 0,52 ^{cde}	17,3 ± 0,59 ^{cde}	11,5 ± 0,48 ^{cde}	30,1 ± 1,17 ^{cde}
MET 12,5	26,1 ± 1,34 ^{de}	18,6 ± 1,20 ^{ef}	30,9 ± 2,83 [†]	11,8 ± 0,32 ^e	14,3 ± 0,37 ^{tg}	9,8 ± 0,30 ^{ef}	25,9 ± 0,71 ^e
MET 15	26,8 ± 1,47 ^{de}	19,4 ± 1,28 ^{ef}	34,8 ± 3,54 ^{ef}	11,4 ± 0,24 ^e	14,0 ± 0,29 ^g	9,4 ± 0,23 ^f	25,3 ± 0,55 ^e
MG 5	44,5 ± 2,16 ^a	35,7 ± 2,05 ^a	47,6 ± 4,12 ^{bcde}	17,9 ± 0,67 ^a	22,6 ± 0,69 ^a	15,4 ± 0,63 ^a	39,9 ± 1,61 ^a
MG 7,5	44,1 ± 2,30 ^a	36,5 ± 2,24 ^a	64,5 ± 3,93 ^{ab}	18,6 ± 0,71 ^a	22,9 ± 0,72 ^a	16,2 ± 0,71 ^a	40,9 ± 1,54 ^a
MG 10	47,3 ± 2,15 ^a	37,7 ± 2,04 ^a	60,6 ± 2,68 ^{abc}	15,4 ± 0,49 ^{ab}	19,4 ± 0,54 ^{ab}	13,2 ± 0,47 ^{ab}	33,9 ± 1,17 ^{ab}
MG 12,5	43,2 ± 2,23 ^a	32,7 ± 2,19 ^{abc}	54,5 ± 3,24 ^{abcde}	14,2 ± 0,56 ^{bcd}	18,2 ± 0,59 ^{bc}	11,8 ± 0,55 ^{bcde}	31,6 ± 1,29 ^{bcd}
MG 15	42,9 ± 1,70 ^a	31,5 ± 1,57 ^{ab}	49,5 ± 3,01 ^{abcde}	12,5 ± 0,32 ^{cde}	16,0 ± 0,37 ^{cdef}	10,4 ± 0,31 ^{cdef}	27,3 ± 0,70 ^{cde}

Motilidade total (MotTot), motilidade progressiva (MotProg), tempo de motilidade (TMot), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média do percurso (VAP), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MET) e metilglicol (MG). Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística (P < 0.05).

Tabela 2: Análises de velocidade curvilínea, velocidade retilínea, retilinearidade, linearidade, oscilação, deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimento flagelar cruzado de espermatozoides descongelados do *Steindachneridion scprutum* (Miranda-Ribeiro 1918) com os álcoois dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol em diferentes concentrações (média ± erro padrão).

Análises de cinética espermática							
Tratamentos (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
DMSO 5	36,5 ± 0,78 ^{bcd}	24,2 ± 0,70 ^{bcde}	0,81 ± 0,005 ^d	0,65 ± 0,008 ^{ab}	0,81 ± 0,006 ^{abcd}	1,53 ± 0,05 ^a	23,1 ± 0,32 ^{def}
DMSO 7,5	36,3 ± 1,01 ^{cd}	24,0 ± 0,79 ^{cdef}	0,81 ± 0,006 ^{bcd}	0,66 ± 0,009 ^{ab}	0,80 ± 0,007 ^{abcd}	1,50 ± 0,07 ^{abc}	22,7 ± 0,44 ^{defg}
DMSO 10	33,1 ± 0,81 ^{de}	21,5 ± 0,62 ^{def}	0,80 ± 0,005 ^d	0,65 ± 0,009 ^{ab}	0,80 ± 0,008 ^{abcd}	1,36 ± 0,06 ^{abc}	21,5 ± 0,38 ^{efg}
DMSO 12,5	33,0 ± 0,82 ^{de}	22,1 ± 0,54 ^{cdef}	0,82 ± 0,005 ^{bcd}	0,67 ± 0,001 ^{ab}	0,81 ± 0,008 ^{abc}	1,42 ± 0,07 ^{abc}	22,7 ± 0,53 ^{defg}
DMSO 15	32,8 ± 0,67 ^{de}	21,7 ± 0,48 ^{cdef}	0,81 ± 0,005 ^d	0,66 ± 0,009 ^{ab}	0,81 ± 0,008 ^{abc}	1,57 ± 0,06 ^{ab}	21,8 ± 0,37 ^{efg}
MET 5	37,1 ± 0,89 ^{bcd}	24,5 ± 0,67 ^{bcd}	0,82 ± 0,005 ^{bcd}	0,66 ± 0,009 ^{ab}	0,80 ± 0,007 ^{abcd}	1,43 ± 0,05 ^{abc}	23,6 ± 0,39 ^{de}
MET 7,5	39,5 ± 1,27 ^{bc}	26,3 ± 1,01 ^{bc}	0,82 ± 0,005 ^{abcd}	0,66 ± 0,009 ^{ab}	0,80 ± 0,008 ^{abcd}	1,41 ± 0,06 ^{abc}	24,7 ± 0,58 ^{cd}
MET 10	37,9 ± 1,35 ^{cd}	25,1 ± 1,07 ^{cdef}	0,82 ± 0,005 ^{bcd}	0,66 ± 0,009 ^{ab}	0,79 ± 0,008 ^{abcd}	1,26 ± 0,04 ^{bc}	23,8 ± 0,53 ^{de}
MET 12,5	31,3 ± 0,84 ^e	21,5 ± 0,65 ^{ef}	0,82 ± 0,005 ^{bcd}	0,68 ± 0,009 ^a	0,83 ± 0,007 ^a	1,26 ± 0,05 ^c	21,0 ± 0,47 ^{fg}
MET 15	30,9 ± 0,69 ^e	20,6 ± 0,50 ^f	0,82 ± 0,005 ^d	0,67 ± 0,009 ^{ab}	0,82 ± 0,007 ^{ab}	1,34 ± 0,06 ^{abc}	21,0 ± 0,44 ^g
MG 5	50,3 ± 1,66 ^a	34,2 ± 1,50 ^a	0,84 ± 0,006 ^{abc}	0,66 ± 0,011 ^{ab}	0,78 ± 0,010 ^{bcd}	1,55 ± 0,07 ^{abc}	28,7 ± 0,50 ^{ab}
MG 7,5	50,5 ± 1,56 ^a	35,6 ± 1,53 ^a	0,85 ± 0,006 ^a	0,68 ± 0,011 ^{ab}	0,80 ± 0,008 ^{abcd}	1,55 ± 0,06 ^{ab}	30,8 ± 0,57 ^a
MG 10	42,6 ± 1,27 ^{ab}	28,9 ± 1,10 ^{ab}	0,84 ± 0,004 ^{ab}	0,68 ± 0,008 ^{ab}	0,79 ± 0,008 ^{bcd}	1,34 ± 0,05 ^{abc}	26,7 ± 0,49 ^{bc}
MG 12,5	40,5 ± 1,36 ^{bc}	26,1 ± 1,23 ^{bcde}	0,81 ± 0,007 ^{bcd}	0,63 ± 0,011 ^b	0,77 ± 0,009 ^d	1,48 ± 0,07 ^{abc}	24,3 ± 0,52 ^{cde}
MG 15	35,0 ± 0,82 ^{cde}	22,5 ± 0,66 ^{cdef}	0,82 ± 0,005 ^{cd}	0,64 ± 0,009 ^{ab}	0,78 ± 0,008 ^{cd}	1,28 ± 0,05 ^{abc}	22,9 ± 0,44 ^{defg}

Velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MET) e metilglicol (MG). Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística (P < 0.05).

Tabela 3: Análises das organelas espermáticas (funcionalidade mitocondrial, funcionalidade de membrana, integridade celular, fluidez de membrana, fragmentação de DNA) e da bioquímica (espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica) dos espermatozoides descongelados do *Steindachneridion scpritum* (Miranda-Ribeiro 1918) com os álcoois dimetilsulfóxido, metanol e metilglicol (média ± erro padrão).

Análises das organelas celulares e da bioquímica espermática							
Tratamentos (%)	FMit (%)	FMe (%)	IC (%)	FM (%)	DNA (%)	ROS (%)	LPO (%)
DMSO 5	47,6 ± 2,4 ^{ab}	40,5 ± 5,0 ^{ab}	51,8 ± 4,4 ^a	46,7 ± 1,9 ^{abc}	0,042 ± 0,003 ^a	9723,6 ± 3553,7 ^a	54,4 ± 6,4 ^a
DMSO 7,5	44,5 ± 2,5 ^{ab}	43,5 ± 5,0 ^{ab}	48,2 ± 4,5 ^a	43,1 ± 2,2 ^{abc}	0,044 ± 0,003 ^a	1822,5 ± 728,7 ^{ab}	53,7 ± 5,9 ^a
DMSO 10	49,1 ± 2,8 ^{ab}	50,4 ± 4,9 ^a	52,8 ± 4,8 ^a	48,9 ± 2,4 ^{abc}	0,051 ± 0,005 ^a	6838,8 ± 2696,4 ^{ab}	54,5 ± 6,3 ^a
DMSO 12,5	51,0 ± 3,1 ^a	53,0 ± 5,0 ^a	48,6 ± 6,7 ^{ab}	50,8 ± 1,6 ^a	0,042 ± 0,002 ^a	4197,2 ± 2469,4 ^{ab}	45,3 ± 6,3 ^a
DMSO 15	51,9 ± 3,2 ^a	48,0 ± 5,0 ^{ab}	42,7 ± 3,3 ^{ab}	50,4 ± 2,3 ^{ab}	0,056 ± 0,011 ^a	983,0 ± 275,9 ^{ab}	44,5 ± 6,3 ^a
MET 5	42,4 ± 2,7 ^{ab}	33,0 ± 4,7 ^{ab}	46,7 ± 3,5 ^{ab}	46,3 ± 1,5 ^{abc}	0,046 ± 0,003 ^a	4960,8 ± 2350,2 ^{ab}	51,4 ± 5,8 ^a
MET 7,5	40,8 ± 2,6 ^{ab}	30,4 ± 5,9 ^{ab}	38,4 ± 3,5 ^{ab}	45,8 ± 2,3 ^{abc}	0,046 ± 0,004 ^a	1757,6 ± 717,4 ^{ab}	47,8 ± 5,8 ^a
MET 10	42,2 ± 2,7 ^{ab}	25,9 ± 5,0 ^b	41,7 ± 2,8 ^{ab}	42,0 ± 2,1 ^{abc}	0,039 ± 0,002 ^a	655,3 ± 196,9 ^{ab}	55,0 ± 6,1 ^a
MET 12,5	46,3 ± 3,6 ^{ab}	32,8 ± 5,6 ^{ab}	44,6 ± 3,5 ^{ab}	38,6 ± 1,5 ^c	0,043 ± 0,003 ^a	3764,8 ± 1638,7 ^{ab}	49,2 ± 6,7 ^a
MET 15	41,4 ± 3,1 ^{ab}	30,6 ± 4,7 ^{ab}	40,9 ± 3,5 ^{ab}	43,9 ± 2,3 ^{abc}	0,051 ± 0,007 ^a	1594,3 ± 595,4 ^{ab}	46,8 ± 5,8 ^a
MG 5	35,1 ± 2,6 ^b	22,5 ± 3,8 ^b	27,5 ± 4,2 ^b	40,2 ± 1,5 ^{bc}	0,038 ± 0,001 ^a	345,9 ± 87,7 ^b	48,5 ± 5,7 ^a
MG 7,5	37,6 ± 2,8 ^{ab}	28,2 ± 4,0 ^{ab}	33,8 ± 4,3 ^{ab}	41,9 ± 2,2 ^{abc}	0,036 ± 0,001 ^a	4298,9 ± 1919,8 ^{ab}	48,8 ± 6,7 ^a
MG 10	39,7 ± 2,7 ^{ab}	36,2 ± 4,4 ^{ab}	32,3 ± 4,2 ^{ab}	43,7 ± 1,9 ^{abc}	0,043 ± 0,003 ^a	1064,0 ± 338,1 ^{ab}	45,7 ± 6,3 ^a
MG 12,5	41,6 ± 3,0 ^{ab}	33,5 ± 4,4 ^{ab}	38,4 ± 4,3 ^{ab}	40,4 ± 1,9 ^{abc}	0,038 ± 0,001 ^a	1639,8 ± 696,7 ^{ab}	33,1 ± 5,5 ^a
MG 15	44,8 ± 2,9 ^{ab}	34,8 ± 4,6 ^{ab}	41,7 ± 4,3 ^{ab}	44,7 ± 2,0 ^{abc}	0,047 ± 0,005 ^a	1045,0 ± 271,2 ^{ab}	44,6 ± 6,2 ^a

Funcionalidade mitocondrial (FMit), funcionalidade de membrana (FMe), integridade celular (IC), fluidez de membrana (FM), fragmentação de DNA (DNA), espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica (LPO), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MET) e metilglicol (MG). Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística (P < 0,05).