



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

BIANKA DOS SANTOS TEIXEIRA

**Efeito da astaxantina na qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma
macropomum*) durante o resfriamento**

Recife
2023

BIANKA DOS SANTOS TEIXEIRA

Efeito da astaxantina na qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante o resfriamento

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Ma. Amanda Pereira de Amaral

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Teixeira, Bianka dos Santos.

Efeito da astaxantina na qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante o resfriamento / Bianka dos Santos Teixeira. - Recife, 2023.

47 : il.

Orientador(a): Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador(a): Amanda Pereira de Amaral

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

1. Andrologia. 2. Bioquímica. 3. Criobiologia. 4. Reprodução Animal. I. Bezerra, Ranilson de Souza. (Orientação). II. Amaral, Amanda Pereira de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

BIANKA DOS SANTOS TEIXEIRA

Efeito da astaxantina na qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante o resfriamento

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação do Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra.

Aprovado em: 01/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

Ma. Amanda Pereira de Amaral (Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Guilherme Melgaço Heluy (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Yugo Moraes Pastrana (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida por me guiar em cada passo.

À minha mãe, **Ana Rita**, por ser meu alicerce e o maior exemplo de bondade que já encontrei. Obrigada por todo o incentivo aos meus estudos e por toda a orientação para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Às minhas irmãs, **Bruna**, **Brenda** e **Briene**, por serem modelos de força e determinação e por todo o apoio à minha escolha de profissão e minha jornada de aprendizado na universidade.

À minha avó **Helena** e ao meu pai de coração, **Vicente**, que mesmo não estando mais fisicamente presentes, permanecerão eternamente no meu coração. Obrigada por todas as lições de vida e por todo amor, carinho e conselhos.

À toda a minha **família** em São José do Egito, Recife e Curitiba e aos amigos de fora dos muros da faculdade. Obrigada por todos os momentos de alegria!

Ao meu professor e orientador **Ranilson Bezerra**, que me acolheu no LABENZ e incentivou o meu desenvolvimento profissional e pessoal através de seus ensinamentos em laboratório e em sala de aula.

À minha coorientadora **Amanda Amaral** por toda orientação, paciência e sabedoria compartilhadas ao longo deste processo.

Às grandes amigadas que nasceram nos corredores do CB e que mantereí por toda a vida, **Andressa Samara** e **Cintia Ferreira**. Compartilhamos as alegrias e desafios ao longo desses anos acadêmicos, agradeço por todas as risadas e conselhos durante essa jornada. Desejo a vocês todo o sucesso do mundo!

À equipe do **LABENZ**, em especial **Vívian** e **Josiane**, por todo o companheirismo e por todas as situações inusitadas que resolvemos juntas.

Às **equipes** do Biotério da Estação de Aquicultura Professor Johei Koike, do Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola e do Laboratório de Andrologia da UFRPE, por fornecerem a estrutura, os recursos e o apoio necessários para a realização desta pesquisa.

À todos os **professores** da Universidade Federal de Pernambuco que contribuíram para minha formação acadêmica como bióloga.

Agradeço também a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, cruzaram meu caminho durante essa jornada. Aos colegas de curso, aos orientadores de monitorias e projetos de extensão, aos membros da LAGEN, muito obrigada!!!

RESUMO

A criopreservação de sêmen é um método que preserva a viabilidade e função dos espermatozoides por um curto prazo (resfriamento) ou longo prazo (congelamento). O tambaqui é um peixe nativo da bacia amazônica com grande potencial para a aplicação de técnicas de criopreservação do sêmen, sendo a segunda espécie mais produzida no Brasil no setor da piscicultura e com perspectivas de crescimento em sua produção. Entretanto, o processo de criopreservação pode causar danos que comprometem a capacidade de fertilização do sêmen, sendo o estresse oxidativo uma das principais fontes de danos. Para mitigar esse efeito, foi testada uma solução diluidora contendo diferentes concentrações de astaxantina, um carotenóide com fortes propriedades antioxidantes bem documentadas na literatura. Foram avaliados os efeitos das concentrações de 1 μ M, 2 μ M e 3 μ M de astaxantina em um diluidor para o resfriamento do sêmen do tambaqui a 5°C por um período de 96 horas. Nos tempos 0 h (logo após atingir a temperatura de resfriamento), 48 h e 96 h de resfriamento, a motilidade e morfologia do sêmen criopreservado foram avaliadas. Os resultados mostraram que a motilidade e morfologia espermática foram afetadas pelas concentrações da astaxantina. Em 48 h de resfriamento, a adição de 2 μ M e 3 μ M de astaxantina apresentaram maior motilidade em comparação ao controle (Tukey, $p < 0,05$). Nesse período, também foi observado que as concentrações de 2 μ M e 3 μ M de astaxantina apresentaram um maior percentual de células normais ($40 \pm 3 \%$ e $44 \pm 5 \%$) comparada aos outros tratamentos ($29 \pm 6 \%$) e um menor percentual de células anormais ($60 \pm 3 \%$ e $56 \pm 5 \%$) do que as outras concentrações testadas ($71 \pm 6 \%$). Em 96h, a concentração de 3 μ M de astaxantina apresentou maior motilidade em relação a todos os outros tratamentos (Tukey, $p < 0,001$). Nesse período também foi observado que a concentração de 3 μ M de astaxantina apresentou mais células normais ($34 \pm 4 \%$) comparada aos outros tratamentos ($19 \pm 4 \%$) e menos células anormais ($66 \pm 4 \%$) do que as outras concentrações testadas ($81 \pm 4 \%$). Os resultados mostram que o uso da astaxantina foi eficiente para ser utilizado na formulação de um diluidor para criopreservação do sêmen de tambaqui, devido suas propriedades benéficas que auxiliam na proteção dos espermatozoides durante o resfriamento.

Palavras-chave: antioxidante; resfriamento; espermatozoide; motilidade; morfologia espermática.

ABSTRACT

Semen cryopreservation is a method that preserves the viability and function of spermatozoa for short-term (cooling) or long-term (freezing) durations. The tambaqui, a native fish of the Amazon basin, holds significant potential for the application of semen cryopreservation techniques. It ranks as the second most produced species in the Brazilian aquaculture sector, with growth prospects in its production. However, the cryopreservation process can induce damages that compromise the fertilization capacity of the semen, with oxidative stress being one of the primary sources of damage. To mitigate this effect, a diluent solution containing different concentrations of astaxanthin, a carotenoid with well-documented strong antioxidant properties in the literature, was tested. The effects of concentrations of 1 μM , 2 μM , and 3 μM of astaxanthin in a diluent for cooling tambaqui semen to 5°C over a 96-hour period, were evaluated. At the 0-hour mark (immediately after reaching the cooling temperature), 48-hour and 96-hour time points of cooling, the motility and morphology of cryopreserved semen were assessed. The results demonstrated that sperm motility and morphology were influenced by the concentrations of astaxanthin. After 48 hours of cooling, the addition of 2 μM and 3 μM of astaxanthin resulted in higher motility compared to the control (Tukey, $p < 0.05$). During this period, concentrations of 2 μM and 3 μM of astaxanthin also exhibited a higher percentage of normal cells ($40 \pm 3\%$ and $44 \pm 5\%$) compared to other treatments ($29 \pm 6\%$), along with a lower percentage of abnormal cells ($60 \pm 3\%$ and $56 \pm 5\%$) compared to other tested concentrations ($71 \pm 6\%$). At 96 hours, the concentration of 3 μM astaxanthin showed an higher motility compared to all other treatments (Tukey, $p < 0.001$). During this period, the concentration of 3 μM astaxanthin also demonstrated a higher percentage of normal cells ($34 \pm 4\%$) compared to other treatments ($19 \pm 4\%$), and a lower percentage of abnormal cells ($66 \pm 4\%$) compared to other tested concentrations ($81 \pm 4\%$). The results indicate that the use of astaxanthin was effective in formulating a diluent for tambaqui semen cryopreservation due to its beneficial properties that assist in protecting spermatozoa during cooling.

Keywords: antioxidant; cooling; spermatozoa; motility; sperm morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxa de motilidade espermática do tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. **30**

Figura 2: Principais formas morfológicas encontradas no sêmen de tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. (a) espermatozoide normal. (b) espermatozoide com flagelo enrolado. (c) espermatozoide com flagelo fortemente enrolado. **31**

Figura 3: Percentual de espermatozoides normais do sêmen tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. **33**

Figura 4: Percentual de espermatozoides anormais do sêmen tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. **34**

Figura 5: Percentual de espermatozoides de tambaqui com flagelo enrolado durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. **35**

Figura 6: Percentual de espermatozoides de tambaqui com flagelo fortemente enrolado durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. **37**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

ANOVA two-way - Análise de Variância com Dois Fatores

AST - Astaxantina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EBHC - Extrato Bruto de Hipófise de Carpa

F - Teste F

h - Hora

kg - Quilo

KH₂PO₄ - Fosfato Monopotássico

L - Litro

LPO - Lipoperoxidação ou Peroxidação Lipídica

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mOsm - Miliosmol

μL - Microlitro

μM - Micromolar

Na₂HPO₄ - Fosfato Dissódico

NaCl - Cloreto de Sódio

pH - Potencial Hidrogeniônico

p - Valor de Probabilidade ou p-value

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Aquicultura no Brasil	16
2.1.1	<i>Espécie</i>	17
2.2	Criopreservação de sêmen	18
2.3	Soluções Diluidoras	21
2.4	A Utilização da Astaxantina como Antioxidante	22
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Animais experimentais	26
4.2	Coleta do sêmen	26
4.3	Composição do diluidor	27
4.4	Delineamento experimental	27
4.5	Avaliação do sêmen de tambaqui refrigerado em diluidor a base de astaxantina	28
4.5.1	<i>Motilidade espermática</i>	28
4.5.2	<i>Morfologia espermática</i>	29
4.6	Análises Estatísticas	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Motilidade espermática	30
5.2	Morfologia espermática	31
5.2.1	<i>Espermatozoides normais</i>	32
5.2.2	<i>Anormalidades totais</i>	33
5.2.3	<i>Principais anormalidades morfológicas do sêmen de tambaqui</i>	35
6	DISCUSSÃO	38

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica utilizada para armazenar material biológico, como células e tecidos, em temperaturas abaixo de sua faixa de temperatura fisiológica, preservando sua viabilidade durante o período de armazenamento (Pegg, 2007). Na criopreservação do sêmen, as baixas temperaturas diminuem a atividade celular dos espermatozoides e assim mantém a viabilidade e função das células por um curto prazo (resfriamento) ou longo prazo (congelamento), permitindo que sejam armazenadas e posteriormente utilizadas em procedimentos de fertilização artificial (Hezavehei *et al.*, 2018).

A criopreservação de sêmen de peixe pode oferecer diversas vantagens, como: simplificar o manejo dos reprodutores durante os procedimentos de inseminação artificial, facilitar o transporte de gametas entre pisciculturas, permitir o uso total do sêmen, disponibilizar sêmen fora do período reprodutivo, favorecer a difusão de material genético entre locais distantes, diminuir os custos com aquisição, manutenção dos reprodutores e com mão de obra (Judycka *et al.*, 2019). Além disso, o material criopreservado pode ser utilizado em programas de repovoamento e, também, de melhoramento genético, bem como abrem espaço para um novo nicho de mercado e renda (Judycka *et al.*, 2019)

Apesar de todas as vantagens da técnica, durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são suscetíveis a danos que podem comprometer sua capacidade de fertilização. Um dos principais fatores que contribuem para esses danos é o estresse oxidativo (Cabrita *et al.*, 2010). Esse fenômeno ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante das células espermáticas. Como resultado, ocorrem danos nas estruturas celulares, como o DNA, proteínas, lipídeos e membranas (Cabrita *et al.*, 2014).

Para contornar esses efeitos negativos, são utilizadas soluções diluidoras de criopreservação. Esses diluidores são formulações que contêm uma combinação de componentes, como sais e moléculas, que ajudam a proteger as células espermáticas durante o processo de criopreservação (Viveiros; Orfão; Leal, 2014).

Uma substância que tem se mostrado promissora é a astaxantina, um carotenóide com fortes propriedades antioxidantes. A incorporação da astaxantina na formulação de diluidores tem sido eficaz para a manutenção da viabilidade celular e combate a geração do estresse oxidativo em técnicas de resfriamento e congelamento em diversas espécies, incluindo mamíferos como ovinos (Fang *et al.*, 2015; Abdi-Benemar *et al.*, 2020), suínos (Guo *et al.*, 2021), cães (Qamar *et al.*, 2020) e até mesmo humanos (Ghantabpour *et al.*, 2022), podendo também ser utilizada em sêmen de peixes, como o tambaqui.

O tambaqui é uma espécie que apresenta grande potencial para a aquicultura, devido ao seu fácil manuseio, rápida taxa de crescimento e aceitação no mercado consumidor (Val; Rolim; Rabelo, 2000). Embora essa espécie seja a segunda mais produzida no Brasil, conforme IBGE 2021, ainda existem desafios tecnológicos a serem superados para otimizar sua produção, como fazer o uso de técnicas de criopreservação dos gametas. Além disso, existe uma preocupação com o estado atual do estoque natural do tambaqui, uma vez que sua população sofre com a sobrepesca há décadas, tornando cada vez mais difícil encontrar peixes de grande porte (≥ 7 kg) próximo a centros urbanos (Tregidgo *et al.*, 2017).

Dessa forma, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da astaxantina na formulação de um diluidor para criopreservação do sêmen de peixes, usando como modelo biológico o tambaqui. Esse diluidor poderá auxiliar no estabelecimento de um protocolo de sucesso para a criopreservação de espermatozoides, com aplicação tanto no manejo de reprodutores quanto em planos de conservação, bem como permitindo também a sua utilização para outras espécies de interesse.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aquicultura no Brasil

A aquicultura consiste na criação de organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas, em ambientes controlados, tais como tanques, viveiros e gaiolas submersas. Esse sistema de produção é constantemente otimizado para alcançar maior produtividade, englobando também o manejo para reprodução, nutrição e combate a patologias que podem afetar esses organismos (Valenti *et al.*, 2021).

O setor da aquicultura representa o segmento de maior expansão na produção global de alimentos (Subasinghe; Soto; Jia, 2009), sendo o Brasil classificado como o 12º maior produtor de peixes cultivados mundialmente (FAO, 2022), com a produção de peixes destinados ao consumo liderada pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pelas espécies nativas de peixes redondos, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Valenti *et al.*, 2021).

Segundo dados do Peixe BR (2022), a produção da aquicultura brasileira ultrapassou 841 mil de toneladas de peixe apenas em 2021, sendo 31,2% desse valor proveniente de espécies nativas, totalizando cerca de 262 mil toneladas. Apesar da maior parte da produção ser destinada ao mercado interno, o Brasil também ganha destaque no mercado internacional, onde o valor total gerado pela exportação de pescado teve um crescimento de 78% em 2021 em relação ao ano anterior, exportando principalmente peixes inteiros e filés de Tilápia (88%), Curimatás (9%), Tambaquis (3%) e outras espécies (Peixe BR, 2022).

De acordo com as projeções da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2022), é esperado que a produção da pesca e aquicultura no Brasil cresça aproximadamente 19,3% até 2030. Isso indica uma tendência contínua de expansão do setor aquícola tanto na economia nacional quanto no panorama global. Com isso, se faz necessário a implementação de tecnologias avançadas para a melhoria da eficiência produtiva e no desenvolvimento sustentável da criação de peixes cultivados (Valenti *et al.*, 2021).

A tilápia do Nilo, espécie exótica de origem africana, vem ganhando espaço na aquicultura brasileira devido à boa adaptabilidade às condições bióticas e abióticas do país (Casseiro, 2018). No entanto, a maior parte da produção de peixes no Brasil ocorre em tanques e gaiolas usados em reservatórios naturais, o que representa um desafio ambiental (Nobile *et al.*, 2020). A justificativa está no fato de que os indivíduos que escapam e invadem os corpos d'água têm o potencial de sobreviver no ambiente natural e estabelecer populações, competindo com espécies nativas por nichos ecológicos e ameaçando a sobrevivência destas espécies (Britton e Orsi, 2012). Portanto, existe uma preocupação de que o cultivo de espécies exóticas na aquicultura provoque uma perda da biodiversidade nativa, dessa forma, o incentivo à produção de espécies nativas de água doce no setor surge como uma potencial alternativa para mitigar os impactos ambientais (Nobile *et al.*, 2020).

2.1.1 Espécie

O tambaqui, espécie de peixe de água doce endêmica da bacia amazônica, apresenta um grande potencial para piscicultura devido ao seu valor de mercado, rápida taxa de crescimento e boa aceitação da carne no mercado consumidor (Kubitza, 2004). É a segunda espécie de peixe mais produzida do Brasil, atingindo 94,6 mil toneladas em 2020, o que representa 16,9% do total produzido pela piscicultura brasileira no respectivo ano, segundo dados do IBGE/PPM (2021). O tambaqui também ocupa a segunda posição em relação aos maiores peixes de escamas de água doce da América do Sul, chegando a medir um metro e a pesar 30 kg em ambiente natural (Araújo-Lima e Goulding, 1998).

O consumo do tambaqui se destaca principalmente na região norte do Brasil, influenciado pelo fator cultural, sendo a região que engloba a maior parte do bioma da Amazônia onde estão os estoques naturais da espécie (Pantoja-Lima *et al.*, 2021). Entretanto, existe uma preocupação com o estado atual do estoque natural do tambaqui, uma vez que sua população sofre com a sobrepesca há décadas, tornando cada vez mais difícil encontrar peixes de grande porte (≥ 7 kg) próximo a centros urbanos (Tregidgo *et al.*, 2017).

O tambaqui faz parte de um grupo de peixes conhecidos como piracema, são peixes migradores que não desovam em água parada e, na maioria dos casos,

nadam contra a correnteza dos rios em direção às nascentes (Pereira, 2007). Quando houver os estímulos ambientais favoráveis para a reprodução do tambaqui, tais como temperatura, fotoperíodo e aumento do fluxo da água (Mylonas; Fostier; Zanuy, 2010), os peixes sexualmente maduros formam cardumes e migram rio acima para desovar na montante (Woynárovich e Van Anrooy, 2005).

Devido a essas características da biologia reprodutiva do tambaqui, em um sistema de produção não há os estímulos naturais que desencadeiam a reprodução (Mehdi e Mousavi, 2011). Logo, é necessário realizar um tratamento com indução hormonal no manejo reprodutivo da espécie (Woynárovich e Van Anrooy, 2005), em que são utilizados hormônio exógenos nos peixes reprodutores para provocar um estímulo artificial que resulte na maturação final dos oócitos e desova nas fêmeas e na produção de um maior volume seminal nos machos (Mylonas; Fostier; Zanuy, 2010; Rizzo e Bazzoli, 2014).

Uma técnica amplamente aplicada para obtenção de gametas de peixes piracema é a hipofisação, onde é utilizado o extrato de hipófise de carpa que contém os hormônios necessários para regulação da fase final de maturação da gônadas, desova e espermição (liberação de esperma) (Zaniboni e Weingartner, 2007).

Após a obtenção do sêmen de tambaqui por técnica de hipofisação, a capacidade dos espermatozoides de se manterem viáveis diminui ao longo do tempo, devido à intensificação dos processos bioquímicos (Rurangwa, 2004) e ação de microrganismos que causam degradação celular (Jenkins, 2011). Com o cenário de destaque que o tambaqui se encontra, surge a necessidade de aprimorar as abordagens de criação em sistemas de produção dessa espécie e impulsionar ainda mais esse setor produtivo, como por exemplo, aplicar técnicas de criopreservação do sêmen (Figuerola *et al.*, 2020).

2.2 Criopreservação de sêmen de peixe

A criopreservação de sêmen é um método que preserva a viabilidade e função dos espermatozoides a curto prazo (resfriamento) ou a longo prazo (congelamento) em condições de baixas temperaturas, permitindo que as células sejam armazenadas por um período prolongado e posteriormente utilizadas em procedimentos de fertilização artificial (Magnotti *et al.*, 2018). O

resfriamento é uma técnica de criopreservação de curto prazo que visa a manutenção da viabilidade dos espermatozoides estocados em temperaturas próximas a 4 °C por horas ou dias, e que pode ser aplicado no manejo reprodutivo de peixes por ser viável, barato e simples de realizar (Contreras *et al.*, 2020).

As baixas temperaturas desempenham um papel crucial na preservação da viabilidade celular na criopreservação. Temperaturas abaixo das temperaturas fisiológicas normais da célula reduzem a atividade metabólica, desacelerando reações internas e diminuindo o consumo de energia, e inibem a proliferação de microrganismos, que podem causar danos às células preservadas (Barbas e Mascarenhas, 2009; Bobe e Labbé, 2009).

O sucesso da aplicação das técnicas de criopreservação depende da proporção de células que permaneceram viáveis após o retorno da solução criopreservada a temperatura ambiente, para que as células retornem ao seu estado de atividade normal e sejam capazes de executar suas funções (Barbas e Mascarenhas, 2009). No caso do sêmen, a viabilidade se refere à capacidade dos espermatozoides de fertilizar o oócito da fêmea, portanto, para analisar essa capacidade dois parâmetros principais são levados em consideração: motilidade espermática e morfologia espermática (Bobe e Labbé, 2010).

A motilidade de células espermáticas é a forma que estas se movimentam no meio, sendo portanto capazes de se mover para alcançar e penetrar o óvulo, aumentando a probabilidade que a fertilização ocorra (Kowalski e Cejko, 2019). Para a maioria das espécies de peixe, os espermatozoides são imóveis no fluido seminal e a motilidade é imediatamente ativada quando estes entram em contato com o meio ativador: a água (Maria; Azevedo; Carneiro, 2009). Como a maioria dos peixes possui fecundação externa, essa estratégia visa economizar energia, permitindo que os espermatozoides permaneçam imóveis até serem expostos ao ambiente externo (Cosson *et al.*, 2008.).

A ativação é controlada pelas diferenças entre a osmolaridade da célula e a do meio, dependendo do tipo e concentração de solutos presentes neste, o meio pode ser hiposmótico ou hiperosmótico (Islam e Akhter, 2011). Geralmente, uma vez que a motilidade é ativada o processo irreversível, de

forma que a célula se torna imóvel e incapaz de fertilizar o ovócito após as reservas energéticas se esgotarem (Maria; Azevedo; Carneiro, 2009). O tempo de motilidade é o intervalo entre a ativação e a perda da viabilidade da maioria das células, este último estágio é determinado quando a motilidade observada está entre 10-20% (Viveiros e Godinho, 2009; Viveiros; Orfão; Leal, 2014). A maioria dos peixes teleósteos tem um tempo de motilidade muito curto, variando de menos de 30 segundos a dois minutos (Islam e Akhter, 2011; Torres; Hu; Tiersch, 2016).

Outro parâmetro frequentemente analisado é a morfologia espermática, referente ao formato dos espermatozoides, que no caso da maioria das espécies de peixes, incluindo o tambaqui, é formado por cabeça, peça intermediária e flagelo (Viveiros; Orfão; Leal, 2014). Um exemplo de alteração morfológica que pode ser observada durante o processo de criopreservação é o alto influxo de água para o interior da célula, o que consequentemente pode deformar a morfologia característica do esperma. Alguns defeitos frequentemente associados a criopreservação são espermatozoides com flagelos enrolados e fortemente enrolados (Hezavehei, 2018).

A motilidade e morfologia são essenciais para determinar a qualidade do sêmen, quanto maior a qualidade, maior a capacidade de fertilização e mais eficiente será o uso do sêmen criopreservado no manejo dos peixes em sistemas de criação (Bobe e Labbé, 2010). No setor da aquicultura, o resfriamento do sêmen é usado em métodos de reprodução em ambientes de criação. Essas técnicas estão ganhando cada vez mais destaque devido às vantagens que trazem para o produtor, como a capacidade de preservar o sêmen coletado quando a maturação sexual dos machos e fêmeas é assíncrona e facilitação do transporte de gametas entre viveiros (Contreras *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o mercado do tambaqui, a espécie nativa mais produzida no Brasil, pode ser beneficiado pelo desenvolvimento de protocolos e produtos comerciais para o resfriamento do sêmen da espécie.

2.3 Soluções Diluidoras

O processo de criopreservação pode causar danos significativos aos espermatozoides, levando ao comprometimento de sua capacidade de fertilização, sendo que uma das principais fontes de danos celulares que podem surgir ao utilizar essa técnica está relacionado ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Magnotti *et al.*, 2018).

Quando presentes em quantidades normais dentro do contexto fisiológico dos espermatozoides, as EROs são cruciais em diversas etapas, como durante a capacitação do espermatozoide, assim como na promoção da motilidade, na capacidade de se ligarem à zona pelúcida dos oócitos e, por consequência, no processo de fertilização (Dutta *et al.*, 2020).

Porém, a exposição a altas concentrações de EROs durante a criopreservação, somado a baixa capacidade antioxidante endógena do sêmen e a altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados na membrana (Aramli *et al.*, 2013), induz, principalmente, ao ataque oxidativo nos ácidos graxos poli-insaturados ligados aos fosfolipídios dos espermatozoides, acarretando a peroxidação lipídica, responsável por alterar a permeabilidade e a fluidez das membranas (Sanocka e Kurpisz, 2004). Além disso, as EROs levam a fragmentação cromossômica e de DNA e carbonilação das proteínas (Hezavehei *et al.*, 2018).

Para mitigar esses efeitos negativos das baixas temperaturas, soluções diluidoras de criopreservação são amplamente utilizadas para proteger as células durante o processo. A função de um diluidor é proporcionar um microambiente favorável à manutenção da viabilidade espermática, pois reduz a competição das células por espaço e oxigênio (Bobe e Labbé, 2010). As soluções diluidoras usadas no resfriamento do sêmen de peixe devem possuir algumas características para garantir o sucesso da aplicação da técnica. É essencial que a concentração dos solutos na composição mantenham a osmolaridade isotônica em relação ao fluido seminal da espécie ou em uma condição que garanta a não ativação da motilidade espermática, que o pH seja mantido estável durante o período de estocagem e que o diluidor contenha antibióticos que atuam na inibição do crescimento microbiano (Maria; Azevedo; Carneiro, 2009).

A composição dos diluidores é formada por sais e biomoléculas que atuarão na manutenção da viabilidade espermática durante o processo de criopreservação, tendo como funções fornecer um meio com pH e osmolaridade adequados, fornecer substrato energético para o metabolismo e motilidade do espermatozoide, reduzir os danos nas membranas e organelas celulares causados pela baixa temperatura e neutralizar de espécies reativas de oxigênio para reduzir o estresse oxidativo (Lahnsteiner *et al.*, 2010; Hezavehei *et al.*, 2018). Uma grande variedade de compostos são testados a fim de otimizar as composições de diluidores, como a incorporação de antioxidantes nas soluções para minimizar o estresse oxidativo e proteger o DNA, proteínas e lipídios espermáticos (Chatterjee e Gagnon, 2001).

2.4 A Utilização da Astaxantina como Antioxidante

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos na natureza responsáveis pela coloração verde-escuro, vermelha, laranja e amarela de plantas e animais, como peixes e crustáceos (Ozogul *et al.*, 2021). Normalmente, os carotenóides são formados por quarenta átomos de carbono a partir da união de oito unidades de isopreno ligadas covalentemente, em que a estrutura pode ser completamente linear ou apresentar anéis em uma ou duas extremidades.

Essa característica estrutural dos carotenóides é a principal responsável por sua capacidade de pigmentação e por atuar como um potente antioxidante (Young e Lowe, 2018; Elvira-Torales *et al.*, 2019). De fato, estudos mostram que os carotenóides podem suprimir o oxigênio singleto, os radicais ânion superóxido e os radicais hidroxila através da formação de endoperóxido ou epóxido e, assim, inibir os efeitos nocivos decorrentes do estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica, além de atuar na proteção contra a foto-oxidação (Maoka, 2020).

A astaxantina é um carotenóide de coloração laranja-avermelhada que pertence ao grupo das xantofilas, ou seja, um derivado oxigenado dos carotenos e que pode ser encontrado naturalmente em algas, leveduras (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), bactérias (*Agrobacterium aurantiacum*), crustáceos e em alguns peixes, como salmão (Ambati *et al.*, 2014; Fakhri *et al.*, 2018). Este carotenóide é amplamente utilizado em diversas aplicações, como suplementos alimentares para

humanos e outros grupos de animais, como peixes e aves, cosméticos e farmacêuticos (Higuera-Ciapara *et al.*, 2007).

Na criopreservação de sêmen, a astaxantina foi testada em uma ampla faixa de concentração e para diferentes animais, inclusive em humanos. Muito sucesso foi observado na adição deste carotenóide na solução de criopreservação, tanto para a técnica de resfriamento quanto para a técnica de congelamento. Por exemplo, para sêmen suíno, observou-se que a adição de 0,5 μM a 500 μM de astaxantina ao meio diluidor melhora a qualidade do sêmen após as técnicas de criopreservação, auxiliando na manutenção de importantes variáveis espermáticas, como: motilidade, viabilidade, integridade da membrana e indicadores de estresse oxidativo (Lee e Kim, 2018; Basioura *et al.*, 2018; Basioura *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2022). No entanto, apesar dos efeitos positivos, Basioura *et al.* (2020) observaram que a suplementação de 15 μM de astaxantina ao diluidor Beltsville Thawing Solution (BTS) causou efeitos contrários ao esperado, sendo prejudicial à qualidade espermática.

Para sêmen ovino, a suplementação do diluente com astaxantina nas concentrações de 2 e 4 μM melhorou a motilidade, a integridade da membrana plasmática e acrossômica, reduziu os níveis de peroxidação lipídica e EROs em amostras refrigeradas a 4°C por até 72 h (Fang *et al.*, 2015) e em amostras congeladas em nitrogênio líquido a -196°C por 24 horas (Abdi-Benemar *et al.*, 2020). Além disso, o sêmen congelado em meio diluidor com concentrações de astaxantina apresentou maior taxa de fertilização em comparação ao diluidor sem suplementação de carotenóides (Abdi-Benemar *et al.*, 2020). O efeito combinado de astaxantina (1 μM) e taurina (35 mM) também foi eficiente na manutenção da qualidade do esperma ovino durante o resfriamento (Neamah e Houbi, 2020) e congelamento (Neamah e Houbi, 2020).

A adição de 1 μM de astaxantina no extensor melhorou a motilidade, viabilidade, integridade da membrana, status acrossômico, atividade mitocondrial, integridade da cromatina e expressão gênica, reparo de danos ao DNA induzidos por oxidação, genes relacionados ao estresse oxidativo, níveis mais altos de expressão de anti-genes apoptóticos e genes associados ao acrossoma de esperma canino criopreservado (Qamar *et al.*, 2020). Para esperma humano criopreservado, efeitos positivos foram observados ao adicionar 1 μM e 100 μM de astaxantina para

proteger contra os efeitos destrutivos do congelamento na qualidade do esperma (Dede e Saylan, 2022; Ghantabpour *et al.*, 2022).

A suplementação de 2 μ M de astaxantina ao diluidor ajudou a manter a qualidade dos espermatozoides touro durante o armazenamento a 5°C (Soren; Singh; Kumar, 2017). Para sêmen de galo, observou-se que o efeito combinado de lactose (0,6%) e astaxantina (0,004%) proporcionou melhores resultados para motilidade progressiva e fragmentação do DNA durante o armazenamento a 5 °C por 48 horas (Bebas *et al.*, 2016).

Portanto, esses estudos evidenciam que a astaxantina desempenha um papel significativo na melhoria da qualidade do esperma de várias espécies diferentes durante o processo de criopreservação e resfriamento, devido a suas propriedades antioxidantes e que também pode ser testada em técnicas de criopreservação de sêmen de peixes. Por isso, essa pesquisa teve como proposta avaliar se a adição da astaxantina na formulação do diluidor para criopreservação do sêmen de tambaqui é capaz de melhorar a qualidade do sêmen refrigerado. Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de preservação do sêmen de tambaqui em ambientes de criação e potencialmente de outras espécies de interesse econômico, impulsionando a piscicultura e o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da astaxantina na formulação de um diluidor para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

3.2 Objetivos específicos

- Testar se a adição de astaxantina no diluidor melhora a motilidade dos espermatozoides de tambaqui refrigerados durante 96h.
- Testar se a adição de astaxantina no diluidor diminui o percentual de anormalidades dos espermatozoides de tambaqui refrigerados durante 96h.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Para a realização dos experimentos foram selecionados 5 peixes oriundos do Biotério da Estação de Aquicultura Professor Johei Koike (EAJK) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Após a seleção, os peixes foram transferidos para um tanque com aeração constante e com monitoramento periódico da qualidade da água (oxigênio dissolvido - $6,10 \pm 0,47$ mg/L; pH - $6,9 \pm 0,2$ e temperatura - 29 ± 1 °C) até a coleta do sêmen. Após 6 horas de seleção, os animais foram anestesiados com solução de eugenol de acordo com metodologia adaptada de Roubach *et al.* (2005).

Primeiro, o eugenol foi diluído em álcool na proporção de 1:5 (5 mL de eugenol: 20 mL de álcool a 70%) e, em seguida, esta solução (25 mL) foi adicionada e homogeneizada em 70 L de água do tanque. Os peixes foram considerados anestesiados após a perda total de equilíbrio (ventre voltado para cima). Atingido este estado, os peixes foram pesados ($11,5 \pm 1$ kg) e, logo em seguida, submetidos ao tratamento hormonal com Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC) via injeção intraperitoneal na dose única de 2,5 mg de EBHC/kg (Gomes; Simões; Araujo-Lima, 2013). Após a indução, os peixes retornaram ao tanque, onde permaneceram até o momento da coleta do sêmen (12 horas após a indução hormonal).

4.2 Coleta do sêmen

Para a obtenção do sêmen, os animais foram retirados do tanque e anestesiados com banho em solução de eugenol (seguindo a mesma metodologia do item "animais experimentais"). Após anestesia, a região urogenital de cada peixe foi seca com papel toalha para evitar a contaminação do sêmen com sangue, fezes, urina ou muco. O sêmen de cada reprodutor foi coletado em seringas de 10 mL, sendo as amostras levadas imediatamente para análise em microscópio óptico. Como critério avaliativo, somente amostras seminais com espermatozoides imóveis (indicação de material não contaminado) e com motilidade espermática $\geq 90\%$ foram utilizadas nos experimentos.

Após a análise inicial feita individualmente para o sêmen de cada peixe, as amostras aptas (sem contaminação e com motilidade após ativação $\geq$ a 90%) foram reunidas para compor um pool de sêmen, que foi realizado para evitar o efeito da variabilidade individual em relação à qualidade e concentração espermática observada em machos reprodutores (Stoss e Holtz, 1983), inclusive encontrada no tambaqui (Vieira *et al.*, 2010). Além disso, a concentração espermática do pool foi ajustada para $5,4 \times 10^8$, para padronizar a quantidade de espermatozoides entre os tratamentos experimentais, conforme Pastrana *et al.* (2019). Após a coleta, os animais ficaram 4 h em quarentena e depois foram devolvidos ao viveiro.

4.3 Composição do diluidor

A formulação do diluidor para a criopreservação do sêmen de tambaqui possui em sua composição frutose e outros coadjuvantes (produto em processo de submissão de patente). Além dos componentes base do diluidor, foi adicionado diferentes concentrações de astaxantina na solução para testar o seu efeito durante o resfriamento do sêmen de tambaqui. As concentrações de astaxantina que foram testadas (1 a 3 μ M) foram baseadas em resultados positivos encontrados para criopreservação do sêmen de outros animais, como ovinos (Fang *et al.*, 2015; Abdi-Benemar *et al.*, 2020), suínos (Guo *et al.*, 2021), cães (Qamar *et al.*, 2020) e humanos (Ghantabpour *et al.*, 2022). O pH e a osmolalidade final da formulação foi ajustado para 7,7 e 300 mOsm/kg, de acordo com as características inerentes ao sêmen da espécie, conforme Pastrana *et al.* (2019).

4.4 Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4x3. O primeiro fator corresponde as três concentrações de astaxantina e o controle (sem astaxantina), e o segundo fator corresponde aos três tempos de estocagem (0, 48 e 96 h). A unidade experimental foi caracterizada por um microtubo contendo 1000 μ L de sêmen diluído, com 5 réplicas por tratamento, totalizando 60 unidades experimentais.

4.5 Avaliação do sêmen de tabaqui refrigerado em diluidor com astaxantina

Após a coleta do sêmen, avaliação inicial da qualidade do material coletado e formação do pool de espermatozoides, a amostra seminal (pool) foi diluída em uma solução contendo três diferentes concentrações de astaxantina (1, 2 e 3 μM) e no tratamento controle (sem astaxantina). As amostras diluídas foram estocadas em microtubos de 1,5 mL na proporção de 1:10 (100 μL de sêmen: 900 μL do diluidor). Após a diluição nos respectivos tratamentos, as amostras seminais foram estocadas em refrigerador, previamente estabilizado à temperatura de resfriamento do sêmen (entre 4 e 6 $^{\circ}\text{C}$), durante 96 h. As unidades experimentais foram avaliadas no tempo inicial (imediatamente após atingir a temperatura de refrigeração), em 48 e 96 h de estocagem, sendo mensurado as seguintes variáveis respostas: motilidade e morfologia espermática.

4.5.1 Motilidade espermática

Antes de iniciar a avaliação da motilidade do sêmen refrigerado, cada microtubo permaneceu por 11 minutos à temperatura ambiente ($26 \pm 0,6$ $^{\circ}\text{C}$), seguido de uma suave homogeneização da amostra e ressuspensão das células com uma micropipeta. É importante ressaltar a necessidade de retornar os espermatozoides à temperatura ambiente, pois em baixas temperaturas as células reduzem seu metabolismo e a taxa de motilidade pode ser subestimada se não forem tomados esses cuidados (Pastrana *et al.*, 2019). Uma alíquota de sêmen resfriado (2 μL) foi colocada em uma lâmina histológica e diluída com 98 μL de água destilada ($28,6 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$). A taxa de motilidade foi avaliada em um microscópio óptico predefinido (ampliação de 10x) e a porcentagem de células móveis foi registrada, atribuindo-se valores de 0 a 100% para o total de células em movimento no campo óptico do microscópio (Maria *et al.*, 2006).

4.5.2 Morfologia espermática

O sêmen diluído foi fixado em solução formol salino tamponado na proporção de 1:100 (10 μ L de sêmen: 990 μ L de solução). A solução fixadora tamponada foi preparada pela dissolução de NaCl 1,8% (150 mL), Na_2HPO_4 4,3% (71,4 mL), KH_2PO_4 4,5% (28,6 mL) e solução comercial de formaldeído 37% (62,5 mL) em 500 mL de água destilada (Hancock , 1956). Em seguida, 50 μ L dessa diluição foram colocados em uma lâmina histológica e imediatamente corados com uma alíquota de 5 μ L do corante rosa de bengala (Streit *et al.*, 2004). Cem espermatozoides foram avaliados em cada lâmina em microscopia de luz (aumento de 100x), com três repetições por unidade experimental. Os espermatozoides mostrando integridade da cabeça, da peça intermediária e das estruturas do flagelo foram considerados células normais. As células anormais foram classificadas como: cabeça solta, cabeça degenerada, peça intermediária degenerada, flagelo solto, flagelo quebrado, flagelo dobrado, flagelo enrolado e flagelo fortemente enrolado. O número de espermatozoides normais e anormais foi expresso como porcentagem de todas as células observadas.

4.6 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados de motilidade foram transformados utilizando a raiz quadrada para atingir os pressupostos da estatística paramétrica. Para todas as variáveis-resposta (motilidade e morfologia espermática) foram realizadas uma análise de variância (ANOVA de duas vias) para verificar se havia diferenças entre os tratamentos de astaxantina e o tempo de resfriamento, seguido do teste de Tukey para apontar onde estavam essas diferenças, caso houvesse. Em todas as análises, o nível de significância foi de 5% e os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

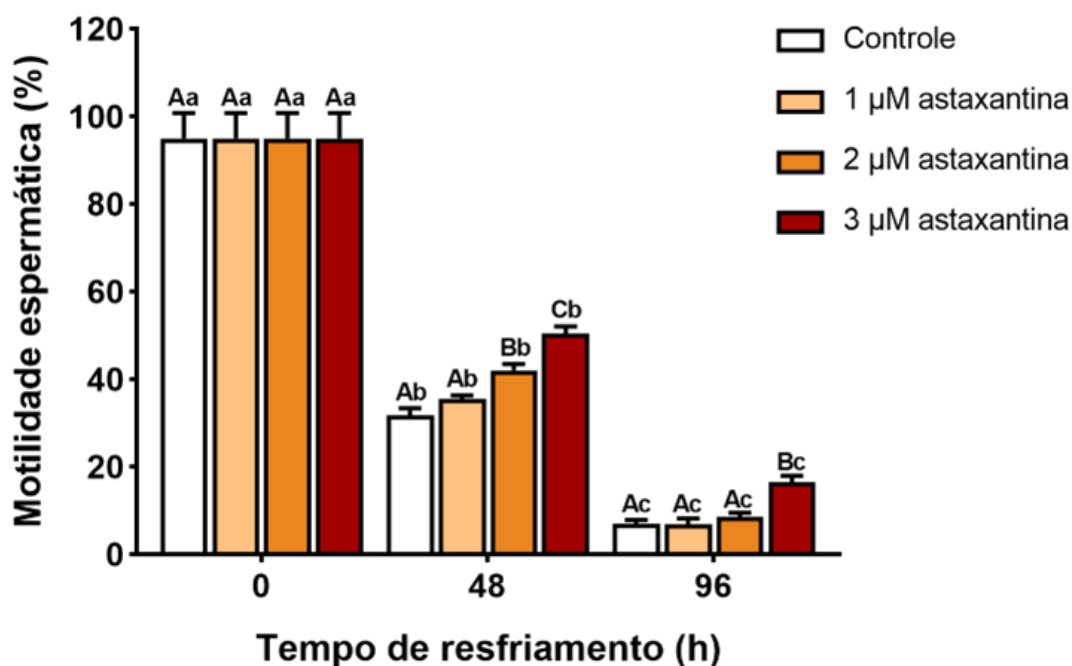
5 RESULTADOS

5.1 Motilidade espermática

A taxa de motilidade espermática foi influenciada por um efeito de interação entre os fatores: concentrações de astaxantina x tempo de resfriamento (ANOVA two-way, $p < 0,001$, Figura 1.), $F = 14,409$ e $p < 0,001$. Todos os dados foram comparados pelo teste de Tukey.

No tempo inicial (0h) não houve diferença no percentual de células móveis ($95 \pm 5 \%$) entre os tratamentos testados. Mas, ao longo das 96 h de resfriamento foi observada, para todos os tratamentos, uma redução da motilidade dos espermatozoides (Tukey, $p < 0,001$). Todavia, em 48 h de resfriamento, as concentrações de 2 μM e 3 μM de astaxantina apresentaram, respectivamente, $42 \pm 1 \%$ e $50 \pm 2 \%$ de motilidade, equivalente a 8 e 14 pontos percentuais a mais de células em movimento em comparação aos outros tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). Além disso, em 96 h de resfriamento, a concentração de 3 μM de astaxantina apresentou um percentual de células móveis ($17 \pm 1 \%$) estatisticamente superior em 8 pontos percentuais em relação a todos os outros tratamentos ($9 \pm 1 \%$) (Tukey, $p < 0,001$).

Figura 1: Taxa de motilidade espermática do tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as concentrações de astaxantina dentro de cada tempo e letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ao longo do tempo de resfriamento para cada tratamento ($p < 0,05$).

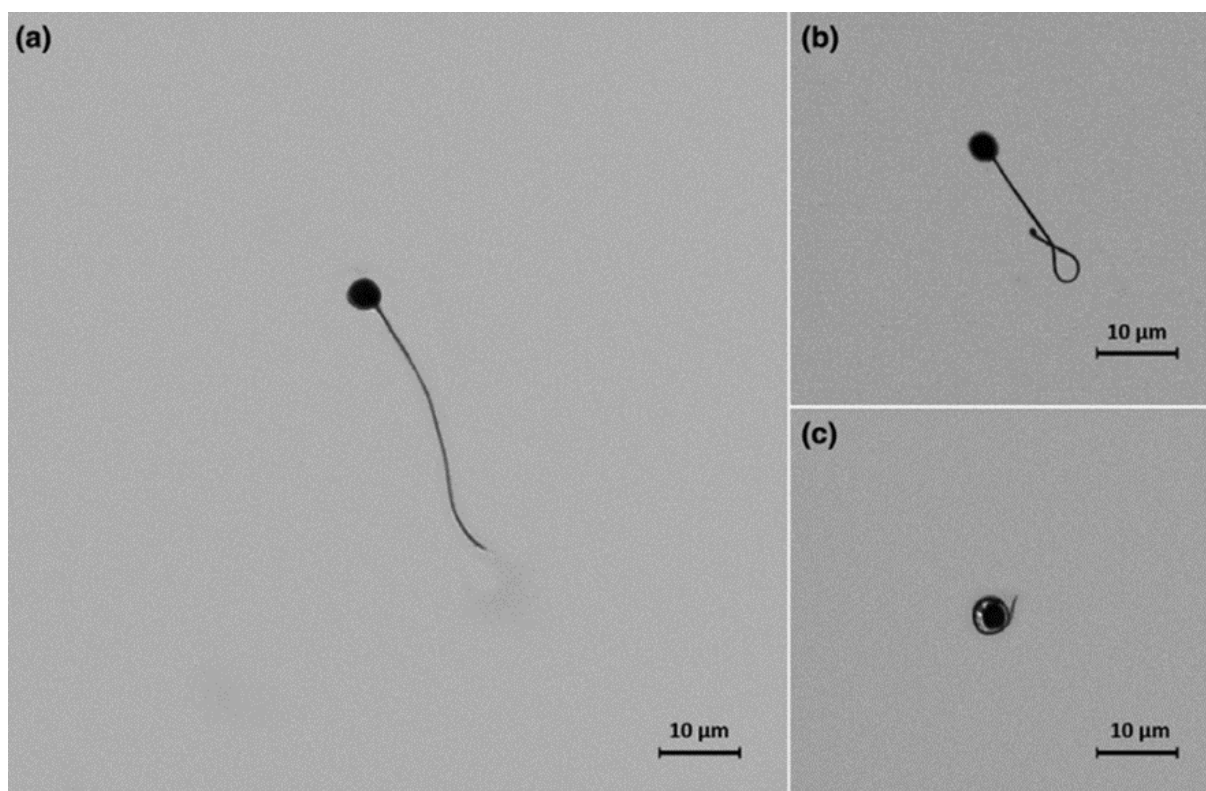


Fonte: A autora (2023).

5.2 Morfologia espermática

As formas morfológicas mais significativas observadas no sêmen de tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina foram: espermatozoides normais, espermatozoides com flagelo enrolado e espermatozoides com flagelo fortemente enrolado (Figura 2). Outros danos foram observados, tais como: cabeça solta, peça intermediária degenerada, flagelo solto, flagelo quebrado e flagelo dobrado. Entretanto, essas anormalidades não foram significativas entre os tratamentos e ao longo do tempo de resfriamento (Tukey, $p > 0,05$).

Figura 2: Principais formas morfológicas encontradas no sêmen de tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. **(a)** espermatozoide normal. **(b)** espermatozoide com flagelo enrolado. **(c)** espermatozoide com flagelo fortemente enrolado.



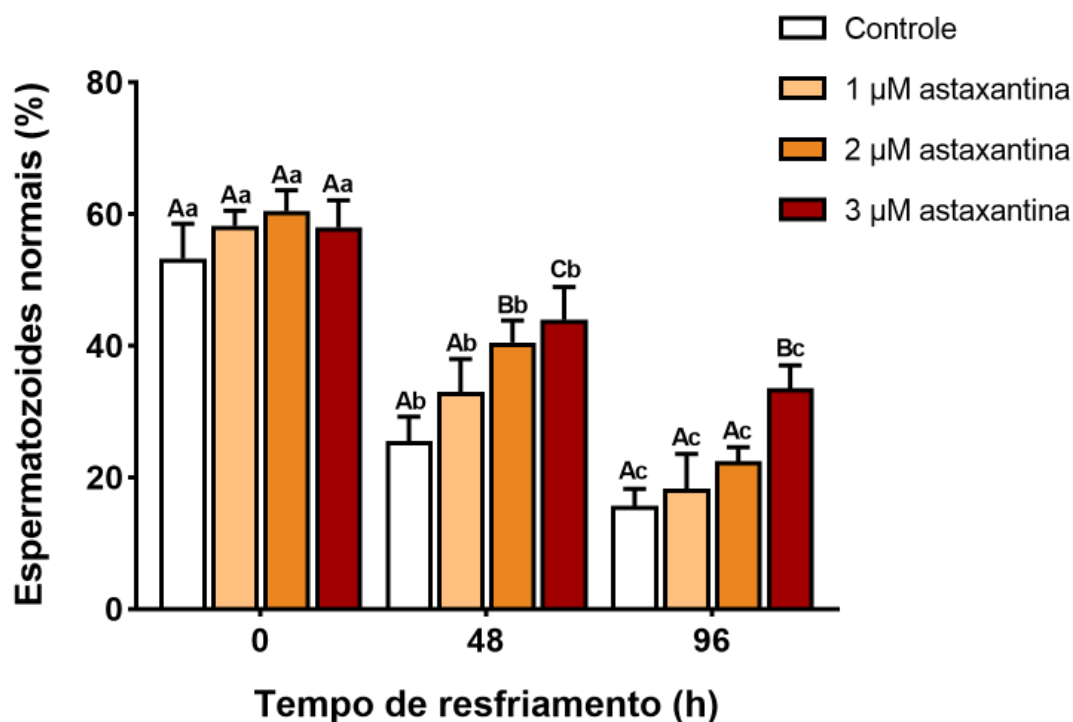
Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.1 Espermatozoides normais

O percentual de espermatozoides normais foi influenciado por um efeito de interação entre os fatores: concentrações de astaxantina x tempo de resfriamento (ANOVA two-way, $p = 0,002$, Figura 3.), $F = 4,458$ e $p = 0,002$. Todos os dados foram comparados pelo teste de Tukey.

No tempo inicial (0h) não houve diferença no percentual de células normais ($58 \pm 4 \%$) entre os tratamentos testados (Tukey, $p > 0,05$). Todavia, em todos os tratamentos houve uma redução na taxa de espermatozoides normais ao longo do tempo (Tukey, $p < 0,05$). No entanto, as concentrações de $2 \mu\text{M}$ e $3 \mu\text{M}$ de astaxantina apresentaram um maior percentual de células normais ($40 \pm 3 \%$ e $44 \pm 5 \%$, respectivamente) em 48 h de resfriamento do que as outras concentrações testadas ($29 \pm 6 \%$) (Tukey, $p < 0,05$). Além disso, em 96 h de resfriamento, a concentração de $3 \mu\text{M}$ de astaxantina apresentou mais células normais ($34 \pm 4 \%$) comparada aos outros tratamentos ($19 \pm 4 \%$) (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 3: Percentual de espermatozoides normais do sêmen tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as concentrações de astaxantina dentro de cada tempo e letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ao longo do tempo de resfriamento para cada tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: A autora (2023).

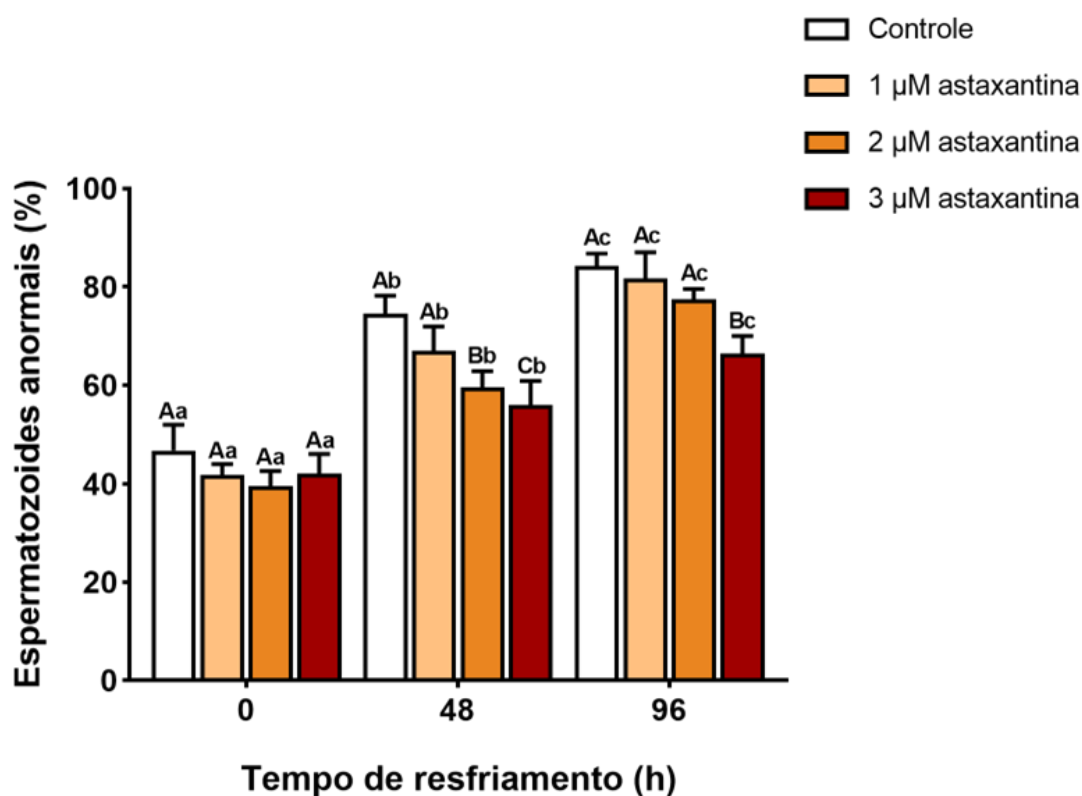
5.2.2 Anormalidades totais

O percentual total de espermatozoides anormais (incluindo danos na cabeça, peça intermediária e flagelo) foi influenciado por um efeito de interação entre os fatores: concentrações de astaxantina x tempo de resfriamento (ANOVA two-way, $p = 0,002$, Figura 4), $F = 4,458$ e $p = 0,002$. Todos os dados foram comparados pelo teste de Tukey.

No tempo inicial (0h) não houve diferença no percentual de células anormais ($42 \pm 4 \%$) entre os tratamentos testados (Tukey, $p > 0,05$). Entretanto, em todos os tratamentos houve um aumento na taxa de espermatozoides anormais ao longo do tempo (Tukey, $p < 0,05$). Porém, as concentrações de 2 µM e 3 µM de astaxantina

apresentaram um menor percentual de células anormais ($60 \pm 3 \%$ e $56 \pm 5 \%$, respectivamente) em 48 h de resfriamento do que as outras concentrações testadas ($71 \pm 6 \%$) (Tukey, $p < 0,05$). Além disso, em 96 h de resfriamento, a concentração de 3 μM de astaxantina apresentou menos células anormais ($66 \pm 4 \%$) comparada aos outros tratamentos ($81 \pm 4 \%$) (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 4: Percentual de espermatozoides anormais do sêmen tambaqui durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as concentrações de astaxantina dentro de cada tempo e letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ao longo do tempo de resfriamento para cada tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: A autora (2023).

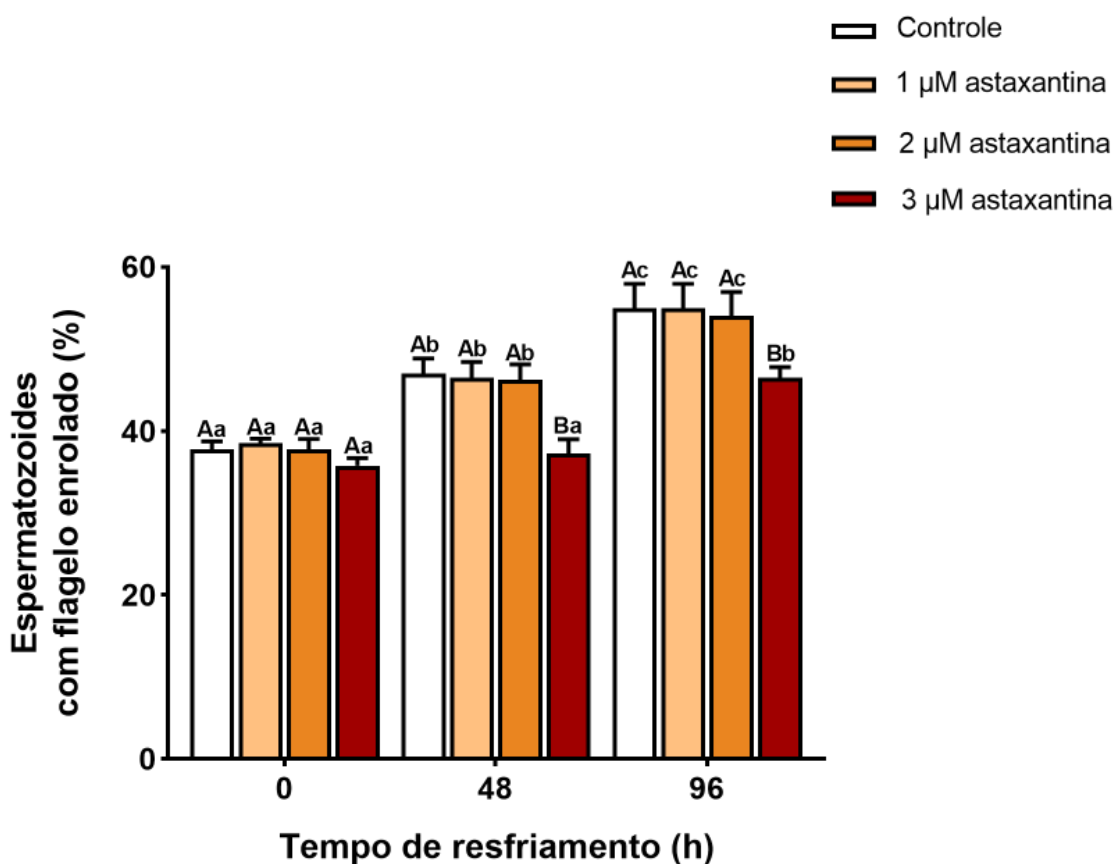
5.2.3 Principais anormalidades morfológicas do sêmen de tambaqui

- *Espermatozoides com flagelo enrolado*

O percentual de espermatozoides com flagelo enrolado foi influenciado por um efeito de interação entre os fatores: concentrações de astaxantina x tempo de resfriamento (ANOVA two-way, $p = 0,024$, Figura 5.), $F = 2,812$ e $p = 0,024$. Todos os dados foram comparados pelo teste de Tukey.

No tempo inicial (0h) não houve diferença no percentual dessa anormalidade ($37 \pm 1 \%$) entre os tratamentos testados (Tukey, $p > 0,05$). Em 48 h de resfriamento, apenas para o tratamento de $3 \mu\text{M}$ de astaxantina não houve um aumento no percentual de espermatozoides com flagelo fortemente enrolado ($37 \pm 2 \%$), diferindo de todos os outros tratamentos testados ($47 \pm 2 \%$) (Tukey, $p = 0,116$). Embora em 96 h de resfriamento todos os tratamentos tenham apresentado um aumento no percentual de células anormais, o tratamento de $3 \mu\text{M}$ de astaxantina foi mais eficiente em proteger as células contra esse dano, apresentando um menor percentual ($47 \pm 1 \%$) comparado aos outros tratamentos ($55 \pm 3 \%$) (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 5: Percentual de espermatozoides de tambaqui com flagelo enrolado durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as concentrações de astaxantina dentro de cada tempo e letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ao longo do tempo de resfriamento para cada tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: A autora (2023).

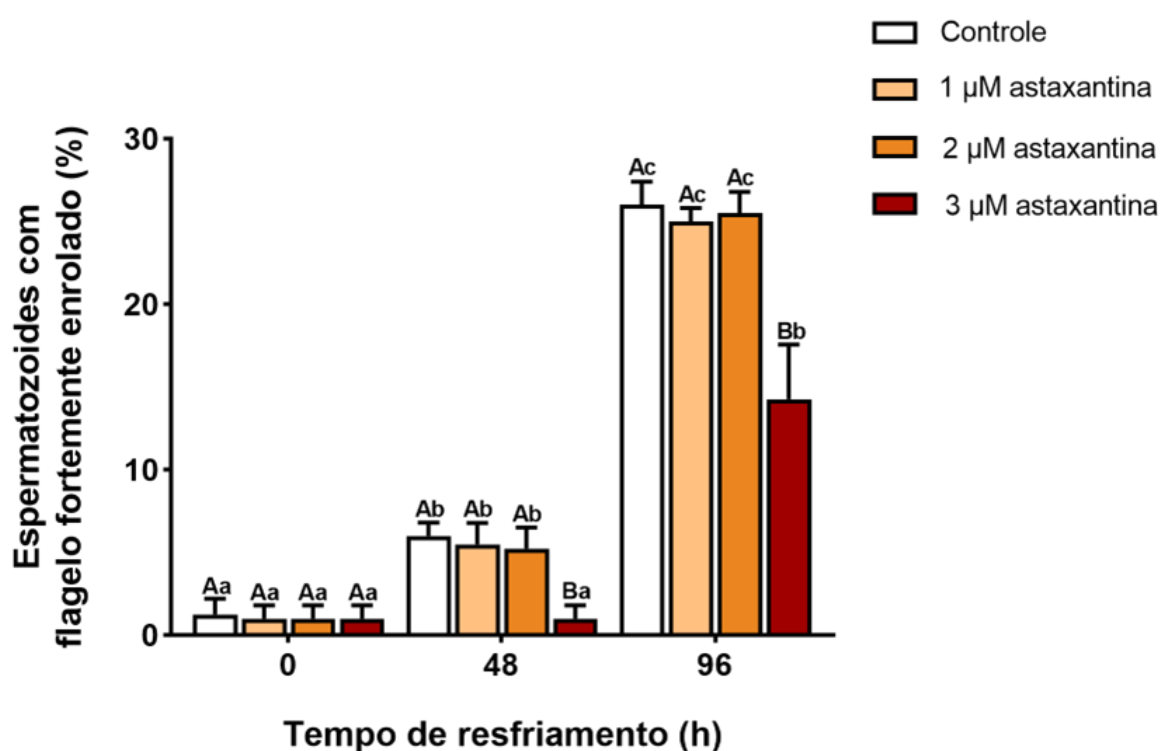
- *Espermatozoides com flagelo fortemente enrolado*

O percentual de espermatozoides com flagelo fortemente enrolado foi influenciado por um efeito de interação entre os fatores: concentrações de astaxantina x tempo de resfriamento (ANOVA two-way, $p < 0,001$, Figura 6.), $F = 15,967$ e $p < 0,001$. Todos os dados foram comparados pelo teste de Tukey.

No tempo inicial (0h) não houve diferença no percentual dessa anormalidade ($1 \pm 1 \%$) entre os tratamentos testados (Tukey, $p > 0,05$). Em 48 h de resfriamento, apenas para o tratamento de 3 μM de astaxantina não houve um aumento no percentual de espermatozoides com flagelo fortemente enrolado ($2 \pm 1 \%$), diferindo de todos os outros tratamentos testados ($5 \pm 1 \%$) (Tukey, $p = 0,116$). Embora em 96 h de resfriamento todos os tratamentos tenham apresentado um aumento no

percentual de células anormais, o tratamento de 3 μM de astaxantina foi mais eficiente em proteger as células contra esse dano, apresentando um menor percentual ($14 \pm 3 \%$) comparado aos outros tratamentos ($26 \pm 1 \%$) (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 6: Percentual de espermatozoides de tambaqui com flagelo fortemente enrolado durante 96 h de resfriamento em um diluidor com diferentes concentrações de astaxantina. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as concentrações de astaxantina dentro de cada tempo e letras minúsculas distintas indicam diferença estatística ao longo do tempo de resfriamento para cada tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: A autora (2023).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados o efeito da astaxantina em relação à motilidade e morfologia dos espermatozoides de tambaqui ao longo de 96 h de resfriamento a 5° C. Os resultados mostraram que a astaxantina, especialmente na concentração de 3 µM, influencia positivamente a qualidade do sêmen do tambaqui refrigerado, melhorando a motilidade e diminuindo os danos morfológicos provocados pelo efeito da baixa temperatura.

Naturalmente é esperado que haja uma diminuição gradual na motilidade dos espermatozoides e aumento de anormalidades morfológicas com o passar do tempo de resfriamento. Isso pode ser atribuído a processos bioquímicos e físicos intrínsecos ao procedimento da técnica, que afetam a viabilidade dos espermatozoides quando expostos a baixas temperaturas por um período prolongado (Pugliesi, 2009). Além do processo de envelhecimento celular dos espermatozoides, que está associado com o tempo de vida do gameta, provocando perda de motilidade no armazenamento *in vitro* (Mann and Lutwak-Mann, 1975).

Um dos principais marcadores de qualidade do sêmen é a motilidade, visto que quanto mais espermatozoides móveis no meio, maiores as chances de interação com o óvulo (Gallego e Asturiano, 2018). No início do resfriamento (tempo 0h), não foram evidenciadas diferenças significativas na motilidade entre os grupos controle e os tratamentos com diferentes concentrações de AST. Entretanto, após 48 e 96 horas de resfriamento, a concentração de 3 µM de astaxantina apresentou uma melhoria significativa na motilidade em comparação aos outros tratamentos. Esse resultado evidencia que a astaxantina pode mitigar os efeitos prejudiciais do resfriamento prolongado sobre a motilidade espermática.

Outro fator que interfere na motilidade é a morfologia, pois quanto mais graves os danos nos componentes estruturais da célula, mais estes comprometem a capacidade dos espermatozoides de realizar os processos metabólicos, comprometendo a motilidade e capacidade de fertilização (Islam e Akhter, 2011). A relação de proporção entre as células normais e anormais observados no início do experimento (tempo 0 h) não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos com AST e o grupo controle, com uma média de anormalidades totais entre os tratamentos de 42%.

As anormalidades podem ser classificadas de acordo com a origem, em que alguns autores dividem em primárias e secundárias, enquanto outros consideram essa distribuição em três categorias, incluindo a terciária (Canisso *et al.*, 2008). De acordo com a classificação mais comumente usada, as anormalidades primárias são inerentes do sêmen, surgindo devido a defeitos genéticos, erros na diferenciação celular na gametogênese e fatores ambientais, enquanto anormalidades secundárias são provenientes de danos gerados após a coleta, induzidos durante manipulação e uso em procedimentos, como o resfriamento (Canisso *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2014). Ou seja, apesar do sêmen no tempo 0 h apresentar 42% de anormalidades, esse resultado é esperado levando em consideração as próprias características morfológicas do sêmen.

Além disso, é importante destacar que diferentes tipos de anormalidades morfológicas podem exercer diferentes efeitos na viabilidade e motilidade celular. Por exemplo, danos na cauda, como flagelo dobrado e enrolado, dificultam a movimentação do espermatozoide no meio, sendo capazes de reduzir a motilidade e, portanto, a capacidade de fertilização (Kavamoto *et al.*, 1999).

Em relação ao flagelo fortemente enrolado que teve uma alta incidência no nosso estudo, Silva *et al.* (2017) relatam que em equinos há um aumento significativo da ocorrência de espermatozoides com cauda fortemente enrolada quando submetidas a 24 h de resfriamento em comparação com o sêmen fresco, atribuindo esse resultado possivelmente ao choque de temperatura sofrido pelas células durante o resfriamento. No presente estudo, foi observado um aumento significativo de anormalidade do tipo flagelo fortemente enrolado no tempo de 96 horas em comparação com o tempo 0 e 48 horas. Esses resultados reforçam que esses danos estão de fato associados a técnica de resfriamento. Mas, por outro lado, o tratamento de 3 μ M de astaxantina foi eficiente em minimizar o surgimento desse dano durante a execução da técnica de resfriamento.

Portanto, a astaxantina se mostrou uma alternativa promissora para ser utilizada na formulação de um diluidor para criopreservação do sêmen de peixes, especialmente a concentração de 3 μ M. Esse resultado está condizente com o que foi encontrado em estudos para outros grupos de animais que avaliam os efeitos da astaxantina na criopreservação de sêmen. Por exemplo, o estudo conduzido por Fang *et al.* (2015) utilizando sêmen de carneiros mostrou que a adição de

astaxantina nas concentrações 2 μM e 4 μM foi capaz de aumentar a motilidade e a integridade da membrana plasmática e diminuir quantidade de EROs e malondialdeído (MDA), sendo o último um produto da lipoperoxidação (LPO) usado como indicador para avaliar a presença de EROs que causam danos nos lipídios insaturados da membrana.

Em outro estudo, Soren *et al.* (2017) testaram os efeitos da adição da astaxantina a 2 μM no resfriamento do sêmen bovino a 5°C e foi observado para os tempos 24, 48 e 72 h que a adição desse antioxidante no meio diluidor diminuiu os estresse oxidativo das células refrigeradas, levando em consideração a avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, enzimas que atuam como antioxidantes neutralizando moléculas que poderiam formar radicais livres ou EROs nas células em situações de estresse oxidativo. Esse estudo também concluiu que a astaxantina é capaz de atuar na preservação da viabilidade das células espermáticas.

Assim como nos estudos mencionados, a melhoria da qualidade do sêmen ao adicionar a AST ao diluidor, caracterizada nesse estudo pelo aumento da motilidade e morfologia normal das células espermáticas, provavelmente está relacionada aos mecanismos de ação antioxidante da molécula, mitigando o estresse oxidativo e protegendo a membrana e os componentes celulares dos danos causados pelo excesso de espécies reativas. A AST neutraliza o oxigênio singleto, espécies reativas de oxigênio e radicais livres gerados metabolicamente ou por estresse ambiental (Seabra, 2010). Ao entrar em contato com espécies reativas, a astaxantina é capaz de doar elétrons transformando-os em produtos inofensivos ou sequestrando esses radicais em seu anel terminal, impedindo assim reações em cadeia que poderiam causar danos aos componentes celulares importantes para a viabilidade da célula, como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (Dhankhar; Kadian; Sharma, 2012).

A ação antioxidante da AST deriva da estrutura molecular formada por uma cadeia conjugada de carbono e grupos funcionais hidroxila e carbonila, fazendo com que este carotenoide possua características lipofílicas e hidrofílicas (Donoso *et al.* 2021). Essa característica permite à AST atravessar as membranas celulares, alcançando o espaço intracelular para atuar em locais onde os radicais livres e as EROs podem causar danos (Donoso *et al.* 2021). Dessa forma, a molécula pode

atuar eliminando os radicais livres tanto fora quanto dentro das células, fazendo com que esse carotenóide tenha uma atividade antioxidante superior a outros antioxidantes restritos a ambientes intra ou extracelulares (Donoso *et al.* 2021).

A avaliação dos efeitos da astaxantina na criopreservação de sêmen de tambaqui mostrou resultados relevantes para o setor da aquicultura, pois a melhora da qualidade espermática é uma peça-chave no aumento das taxas de fertilização, o que por sua vez, aumenta a eficácia da reprodução de peixes em ambientes de criação. Entretanto, mais estudos são necessários para validar a aplicação prática do diluidor, de forma que seja possível a utilização deste produto de forma comercial, o que ainda não é realidade para a piscicultura, como já é para outras espécies, como suínos e bovinos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da astaxantina foi eficiente para ser utilizado na formulação de um diluidor para criopreservação do sêmen de tambaqui, devido suas propriedades benéficas que auxiliam na proteção dos espermatozoides durante o resfriamento, destacando-se sua alta propriedade antioxidante, responsável por atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo gerado durante o armazenamento em baixas temperaturas. Esse estudo abre portas para mais estudos, que visem a possibilidade da formulação de um diluidor comercial, produto ainda inexistente para sêmen de peixes, e que poderá contribuir tanto para a produção de espécies de interesse comercial quanto em programas de conservação de espécies ameaçadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI-BENEMAR, H.; KHALILI, B.; ZAMIRI, M. J.; EZAZI, H.; ARDABILI, G. S.; MOGHADAM, S. H.; SIMANOOR, N. Effects of astaxanthin supplementation on the freezability, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 192, p. 106213, 2020.
- AMBATI, R. R.; PHANG, S. M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. **Marine drugs**, v. 12, n. 1, p. 128-152, 2014.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: **Sociedade Civil Mamirauá**, p. 186, 1998.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and tissue banking**, v. 10, p. 49-62, 2009.
- BASIOURA, A.; BOSCOS, C. M.; PARRILLA, I.; TSOUSIS, G.; TSAKMAKIDIS, I. A. Effect of astaxanthin on the quality of boar sperm stored at 17 C, incubated at 37 C or under in vitro conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 2, p. 463-471, 2018.
- BASIOURA, A.; TSAKMAKIDIS, I. A.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; LI, J.; MOLINA, M. F.; THEODORIDIS, A.; BOSCOS, C. M.; PARRILLA, I. Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar semen. **Animal reproduction science**, v. 218, p. 106478, 2020.
- BEBAS, W.; PEMAYUN, T. G. O.; DAMRIYASA, I. M.; MANTIK-ASTAWA, I. N. Lactose-astaxanthin increases green jungle fowl's sperm motility and reduces sperm DNA fragmentation during 5° Celsius storage. **Bali Medical Journal**, v. 4, n. 3, p. 152-156, 2016.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Chilled storage of sperm and eggs. *In*: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Eds). **Methods in Reproductive Aquaculture – Marine and Freshwater**. Boca Raton: CRC Press, cap. 6, p. 219-235, 2009.
- BRITTON, J. R.; ORSI, M. L. Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil: economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 555-565, 2012.
- CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; GAVAIA, P. J.; RIESCO, M. F.; VALCARCE, D. G.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P.; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389-401, 2014.
- CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., HERRÁEZ, M.P. Cryopreservation of fish sperm:

applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, E. C.; LIMA, A. L. Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2008.

CASSEMIRO, F. A.; BAILLY, D.; GRAÇA, W. J.; AGOSTINHO, A. A. The invasive potential of tilapias (*Osteichthyes*, *Cichlidae*) in the Americas. **Hydrobiologia**, v. 817, p. 133-154, 2018.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 59, n. 4, p. 451-458, 2001.

CONTRERAS, P.; DUMORNE, K.; ULLOA-RODRÍGUEZ, P.; MERINO, O.; FIGUEROA, E.; FARIAS, J. G.; RISOPATRON, J. Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1373-1389, 2020.

COSSON, J.; GROISON, A. L.; SUQUET, M.; FAUVEL, C.; DREANNO, C.; BILLARD, R. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 460-486, 2008.

DEDE, G.; SAYLAN, A. The effect of astaxanthin on human sperm parameters after cryopreservation. **Canadian Urological Association Journal**, v. 16, n. 11, p. E552, 2022.

DHANKHAR, J.; KADIAN, S. S.; SHARMA, A. Astaxanthin: A potential carotenoid. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 3, n. 5, p. 1246, 2012.

DONOSO, A.; GONZÁLEZ-DURÁN, J.; MUÑOZ, A. A.; GONZÁLEZ, P. A.; AGURTO-MUÑOZ, C. Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials. **Pharmacological Research**, v. 166, p. 105479, 2021.

DUTTA, S.; HENKEL, R.; SENGUPTA, P.; AGARWAL, A. Physiological Role of ROS in Sperm Function. In: Parekattil S., Esteves S., Agarwal A. (Eds). **Male infertility: Contemporary clinical approaches, Andrology, ART and antioxidants**. Berlin/Heidelberg: Springer, p. 337-345, 2020.

ELVIRA-TORALES, L. I.; GARCÍA-ALONSO, J.; PERIAGO-CASTÓN, M. J. Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, p. 229, 2019.

FAKHRI, S.; ABBASZADEH, F.; DARGAHI, L.; JORJANI, M. Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits. **Pharmacological research**, v. 136, p. 1-20, 2018.

FANG, Y. I.; ZHONG, R.; CHEN, L.; FENG, C.; SUN, H.; ZHOU, D. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. **Small ruminant research**, v. 130, p. 178-182, 2015.

FIGUEROA, E.; SANDOVAL, L.; MERINO, O.; FARÍAS, J.; RISOPATRÓN, J.; VALDEBENITO, I. Standard and innovative reproductive biotechnologies for the development of finfish farming. *In*: PRESICCE, G. A. (Eds). **Reproductive Technologies in Animals**. Arsial: Academic Press, cap.11, p. 161-180, 2020.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 697-724, 2019.

GHANTABPOUR, T.; NASHTAEI, M. S.; NEKOONAM, S.; REZAEI, H.; AMIDI, F. The effect of astaxanthin on motility, viability, reactive oxygen species, apoptosis, and lipid peroxidation of human spermatozoa during the freezing–thawing process. **Biopreservation and Biobanking**, v. 20, n. 4, p. 367-373, 2022.

GOMES, C. L.; SIMÕES, N. L.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *In*: BALDISSEROTTO B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2013. cap.7, p. 175-204.

GUO, H. T.; WANG, J. R.; SUN, L.Z.; JIN, X. H.; SHI, X. Y.; LIN, J. Y.; YUE, S. L.; ZHOU, J. B. Effects of astaxanthin on plasma membrane function and fertility of boar sperm during cryopreservation. **Theriogenology**, v. 164, p. 58-64, 2021.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 76, n. 3, p. 84-97, 1956.

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H. M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive biomedicine online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185-196, 2007.

HU, Y.; HU, J.; PANG, W.; YANG, G.; CHU, G. Astaxanthin improves preserved semen quality at 17° C by enhancing sperm antioxidant and motility properties. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 10, p. 1187-1197, 2022.

ISLAM, M. S.; AKHTER, T. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. **Advances in Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2011.

JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. **Theriogenology**, v. 132, p. 12–21, 2019.

KAYA, A.; BIRLER, S.; ENWALL, L.; MEMILI, E. Determinants of sperm morphology. *In*: CHENOWETH, P. J.; NORTON, S. P. (Eds). **Animal Andrology: Theories and Applications**. Wallingford, UK: CAB International, p. 34-56, 2014.

KOWALSKI, R.; CEJKO, B. I. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. **Theriogenology**, v. 135, p. 94-108, 2019.

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 82, p. 27-39, 2004.

LEE, E.; KIM, D. Effects of astaxanthin on miniature pig sperm cryopreservation. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-9, 2018.

MAGNOTTI, C.; CERQUEIRA, V.; LEE-ESTEVEZ, M.; FARIAS, J. G.; VALDEBENITO, I.; FIGUEROA, E. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 15-25, 2018.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Biochemical aspects of aging in spermatozoa in relation to motility and fertilizing ability. *In*: BLANDAU, R. J. (Eds) **Aging Gametes: Their Biology and Pathology**. Karger Publishers, 1975. p. 122-150.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. *In*: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. cap.3, p. 47-63.

MARIA, A. N., VIVEIROS, A. T. M., FREITAS, R. T. F., OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, n. 1-4, p. 298-306, 2006.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of natural medicines**, v. 74, n. 1, p. 1-16, 2020.

MEHDI, Y.; MOUSAVI, S. E. A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 7, p. 1643-1650, 2011.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 516-534, 2010.

NEAMAH, H. J.; HOUBI, A. A. Effect of adding astaxanthin and taurine as antioxidants to improve characteristics of awassi ram semen after freezing storage. **Plant archives**, v. 20, n. 1, p. 604-608, 2020.

NEAMAH, H. J.; HOUBI, A. A. Effect of adding astaxanthin and taurine to the Tris extender on the semen quality of Awassi rams during cooling storage. **Annals of Tropical Medicine and Public Health**, v. 23, n. 7, 2020.

NOBILE, A. B.; CUNICO, A. M.; VITULE, J. R. S.; QUEIROZ, J., VIDOTTO-MAGNONI, A. P.; GARCIA, D. A. Z.; ORSI, M. L.; LIMA, F. P.; ACOSTA, A. L.; SILVA, R. J.; PRADO, F. D.; PORTO-FORESTI, F.; BRANDAO, H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; RAMOS, I. P. Status and recommendations for sustainable freshwater aquaculture in Brazil. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1495-1517, 2020.

OZOGUL, F.; CAGALJ, M.; SIMAT, V.; OZOGUL, Y.; TKACZEWSKA, J.; HASSOUN, A.; KADDOUR, A. A.; KULEY, E.; RATHOD, N. B. Recent developments in valorisation of bioactive ingredients in discard/seafood processing by-products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 559-582, 2021.

PANTOJA-LIMA J.; ROCHA, M. J. S.; CASTRO, L. A.; AMARAL, A. C.; SCHERER C. F.; PAIXAO, R. V.; FEIJO, J. C.; ARAUJO, H. S.; ARIDE, P. H. R.; OLIVEIRA, A. T.; MATTOS, B. O. O estado da piscicultura na Amazônia Brasileira. *In*: MATTOS, B. O.; PANTOJA-LIMA, J.; OLIVEIRA, A. T.; ARIDE, P. H. R. (Org.). **Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias**. 1ed. Ponta Grossa: Atena Editora, p. 86-102, 2021.

PASTRANA, Y. M.; STREIT JR, D. P.; GARCIA, R. R. F.; BECKER, B. S.; RODRIGUES, J. L.; GODOY, L. A fructose-based extender protects *Colossoma macropomum* spermatozoa against chilling injuries. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 2, p. 521-528, 2019.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. *In*: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds). **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press, p. 39-57, 2015.

PEIXE, B. R. Anuário peixe BR da piscicultura. São Paulo, **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2022.

PEREIRA, H. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL (PPM): **IBGE**. Rio de Janeiro, v. 49, p.1-12, 2021.

PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores. Tese de Mestrado, **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-MG, 2009.

QAMAR, A. Y.; FANG, X.; BANG, S.; SHIN, S. T.; CHO, J. The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 9, p. 1163-1171, 2020.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reprodução e embriogênese. *In*: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Eds). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: Editora FUNEP, cap.11, p. 265-284, 2014.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier).

Aquaculture Research, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 1-28, 2004.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells.

Reproductive biology and endocrinology, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2004.

SILVA, L. T.; MAIA, M. S.; AQUINO, J. J. M.; MOURA, C. E. B. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 22-25, 2017.

SOREN, S.; SINGH, S. V.; KUMAR, S. Effect of astaxanthin supplementation on semen (Karan fries bulls) storage at 5 C. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 5, p. 23-28, 2017.

STOSS, J.; HOLTZ, W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. **Aquaculture**, v. 31, n. 2-4, p. 275-282, 1983.

STREIT-JUNIOR, D. P.; DE MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; DE SOUZA, E. D.; DE OLIVEIRA, C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 2, 2004.

SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; JIA, J. Global aquaculture and its role in sustainable development. **Reviews in aquaculture**, v. 1, n. 1, p. 2-9, 2009.

TORRES, L.; HU, E.; TIERSCH, T. R. Cryopreservation in fish: current status and pathways to quality assurance and quality control in repository development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 8, p. 1105-1115, 2016.

VAL, A. L.; ROLIM, P. R.; RABELO, H. Situação atual da aqüicultura na Região Norte. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Eds). **Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 247-266, 2000.

VIEIRA, M. J. A. F.; CARVALHO, M. A. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; SALGUEIRO, C. D. M.; VIVEIROS, A. T. M.; MOURA, A. A. A. N.; NUNES, J. F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de zootecnia**, v. 60, n. 232, p. 1263-1270, 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150, 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e conservação de espermatozoides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.

(Eds). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, p. 307-327, 2014.

WOYNÁROVICH, A.; VAN ANROOY, R. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper**, n. 624, p. I-121, 2019.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. L. Carotenoids—antioxidant properties. **Antioxidants**, v. 7, n. 2, p. 28, 2018.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.