UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LEONARDO QUEIROZ DE ALENCAR

Qualidade do sêmen criopreservado de reprodutores selvagens e cultivados de *Pogonias courbina*

Porto Alegre
2026

Leonardo Queiroz De Alencar
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 27.03.2026
Pela Banca Examinadora

Homologado em:
Por

gov.br Documento assinado digitalmente
DANILO PEDRO STREIT JUNIOR
Data: 07/04/2026 12:40:10 -0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Ines Andretta Assinado de forma digital por Ines Andretta
Dados: 2026.05.19 08:51:55 -0300

DANILO PEDRO STREIT JUNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

INES ANDRETTA
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

gov.br Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE NIZIO MARIA
Data: 07/04/2026 08:12:03 -0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Alexandre Nizio Maria
EMBRAPA

Documento assinado digitalmente
Caio Cesar Franca Magnotti
Data: 07/04/2026 14:10:01 -0300
CPF: [illegible]
Verifique as assinaturas em https://v.ufsc.br

Caio Cesar Franca Magnotti
UFSC

gov.br Documento assinado digitalmente
JAYME APARECIDO POVH
Data: [illegible]
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Jayme Aparecido Povh
UFMS

PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Diretor da Faculdade de Agronomia

CIP - Catalogação na Publicação

de Alencar, Leonardo Queiroz
Qualidade do sêmen criopreservado de reprodutores selvagens e cultivados de Pogonias courbina / Leonardo Queiroz de Alencar. -- 2026.
80 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Coorientador: Thales de Souza França.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Criopreservação espermática. 2. Qualidade seminal. 3. Pogonias courbina. I. Streit Jr, Danilo Pedro, orient. II. França, Thales de Souza, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Qualidade do sêmen criopreservado de reprodutores selvagens e cultivados de *Pogonias courbina*

LEONARDO QUEIROZ DE ALENCAR
Zootecnista/ Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, na Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Danilo Pedro Streit Jr.
Coorientador: Dr. Thales De Souza França.

Porto Alegre
2026

Agradecimentos

Sou extremamente grato por ter uma família que sempre me apoiou. Vocês foram fundamentais em toda a minha trajetória profissional e pessoal, sendo a base que me fortalece todos os dias.

Agradeço aos meus pais, Valda Queiroz e Carlos Leôncio, por todo o empenho, dedicação e amor na minha criação. Nunca mediram esforços para me ajudar, e isso é simplesmente incrível. Muito obrigado. Aos meus irmãos, Laísla Alencar e Carlos Neto, vocês são uma grande fonte de inspiração, pela determinação e foco que demonstram diariamente. Às minhas sobrinhas, Agnes e Ayla, tudo o que faço também é por vocês.

Sou profundamente grato à minha companheira de vida, Eloah Roberta, por todo o incentivo, apoio e parceria ao longo dessa jornada.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Danilo Pedro Streit Jr., pela confiança, pelas oportunidades concedidas e por todo o conhecimento compartilhado ao longo desta trajetória.

Ao meu coorientador, Dr. Thales de Souza França, agradeço o apoio, acolhimento e pelas conversas enriquecedoras que contribuíram significativamente para o meu crescimento.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Isadora Zavaglia, Nathalia Teixeira, Raquel Barboza, Jhony Lisboa, Eduardo Nicoleti, Gregory Gutiérrez e Vitor Bazilio, agradeço por todo o apoio, ensinamentos e colaboração na realização dos experimentos.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela estrutura oferecida, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Kamy, Caio, Dudu, Ana Laura e Leo, pessoas incríveis com quem aprendi muito e que, mesmo à distância, estiveram presentes com incentivo e apoio desde o início desta etapa.

Qualidade do sêmen criopreservado de reprodutores selvagens e cultivados de *Pogonias courbina*

Autor: Leonardo Queiroz de Alencar

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr

Coorientador: Thales de Souza França

Resumo: A miraguaia, *Pogonias courbina*, é uma espécie demersal da família Sciaenidae distribuída ao longo da costa da América do Sul, cujo estoque natural brasileiro é considerado colapsado e atualmente classificado como “Em Perigo”. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um protocolo de criopreservação espermática para *P. courbina* selvagem e de um estoque de reprodutor. O sêmen foi criopreservado utilizando uma solução crioprotetora contento: HBSS, gema de ovo e dimetilsulfóxido (DMSO), sendo posteriormente avaliados parâmetros morfológicos, morfométricos, concentração espermática e cinética espermática por CASA. Indivíduos de origem selvagem apresentaram maior frequência de espermatozoides com cauda curta (19,94 ± 4,07%), enquanto os animais de um estoque de reprodutor apresentaram maior frequência de cauda fortemente enrolada (23,71 ± 9,28%) e macrocefalia (0,86 ± 0,54%). A motilidade (MOT) dos espermatozoides foi significativamente superior nas amostras de animais de estoque de reprodutores (71,76 ± 11,81%) em comparação às de origem selvagem (37,34 ± 17,61%). Além disso, os animais de um estoque de reprodutor apresentaram maior progressividade (PROG = 2.782 ± 498,1 µm), enquanto os indivíduos selvagens apresentaram maiores velocidades em linha reta (VSL = 110,7 ± 6,41 µm/s) e retilinearidade (STR = 88,51 ± 5,76%). Em conjunto, os resultados indicam que o protocolo de criopreservação foi eficaz na preservação de parâmetros relevantes da qualidade seminal em ambas as origens. No entanto, diferenças biológicas e de manejo podem influenciar a resposta espermática ao congelamento, reforçando integração de gametas provenientes dessas diferentes origens representa uma estratégia promissora para programas de reprodução assistida, combinando variabilidade genética selvagem com disponibilidade controlada de reprodutores.

Palavras-chave: criopreservação espermática; conservação ex situ; qualidade seminal; reprodutores selvagens e de aquacultura.

Cryopreserved Semen Quality of Wild and Cultured *Pogonias courbina* Broodstock

Author: Leonardo Queiroz de Alencar

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr

Co-advisor: Thales de Souza França

Abstract: The Southern black drum, *Pogonias courbina*, is a demersal species of the family Sciaenidae distributed along the coast of South America, whose Brazilian natural stock is considered collapsed and currently classified as Endangered. The objective of this study was to evaluate the efficacy of a sperm cryopreservation protocol for *P. courbina*, comparing post-thaw semen quality between males of wild origin (n = 4) and captive origin (n = 7). Semen was cryopreserved using HBSS, egg yolk, and dimethyl sulfoxide (DMSO), and subsequently analyzed for morphological, morphometric, sperm concentration, and sperm kinetic parameters using CASA. Differences between origins were observed in some sperm parameters. Individuals of wild origin showed a higher frequency of short-tail spermatozoa (19.94 ± 4.07%), whereas captive individuals presented a higher frequency of strongly coiled tails (23.71 ± 9.28%) and macrocephaly (0.86 ± 0.54%). Sperm motility (MOT) was significantly higher in samples from captive animals (71.76 ± 11.81%) compared to those from wild individuals (37.34 ± 17.61%). In addition, captive animals exhibited higher progressive movement (PROG = 2,782 ± 498.1 μm), whereas wild individuals showed higher straight-line velocity (VSL = 110.7 ± 6.41 μm/s) and straightness (STR = 88.51 ± 5.76%). Overall, the results indicate that the cryopreservation protocol was effective in preserving relevant semen quality parameters in both origins. However, biological and management differences may influence the sperm response to freezing. The integration of gametes from these different origins represents a promising strategy for assisted reproduction programs, combining natural genetic variability with the controlled availability of captive broodstock.

Keywords: sperm cryopreservation; ex situ conservation; sperm quality; wild and captive broodstock.

RELAÇÃO DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Exemplar de *Pogonias courbina*.....14

Figura 2. Esquema que demonstra os parâmetros analisados e estimados pelo software CASA.....24

MANUSCRITO

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental adotado para a comparação da qualidade do sêmen criopreservado de *Pogonias courbina*.....47

Figura 2. Parâmetros de morfologia espermática de sêmen fresco de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4).....52

Figura 3. Largura da cabeça (A), comprimento da cabeça (B) e comprimento da cauda (C) dos espermatozoides de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e de origem selvagem (verde - n = 4).....52

Figura 4. Parâmetros de concentração espermática do sêmen fresco de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4).....53

Figura 5. Parâmetros de morfologia espermática de sêmen criopreservado de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4).....54

Figura 6. Parâmetros de motilidade e cinética espermática de sêmen criopreservado de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4).....55

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mg/L - Miligrama por litro

µL - Microlitro

VCL - Velocities curvilinear

VAP - Average path

VSL - Straight-Line

STR - Straightness

BCF - Beat Cross Frequency

WOB - Wobble

% - Porcentagem

Kg - Quilograma

DMSO - Dimetilsulfóxido

°C - Grau Celsius

Min - Minutos

CASA - Computer Assisted Sperm Analysis

mOsm/kg - Miliosmoles por quilograma

mOsm/L – Miliosmoles por litro

cm - Centímetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 12

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

2.1 *Pogonias courbina* 14

2.2 Criopreservação espermática 17

2.3 Análise de qualidade espermática 20

2.4 Análise cinética espermática computadorizada (CASA) 21

2.5 Análise da morfologia, morfometria e concentração espermática 24

3. HIPÓTESE 29

4. OBJETIVOS.....30

4.1 Objetivo geral.....30

4.2 Objetivos específicos.....30

5. REFERÊNCIA.....31

MANUSCRITO.....42

1. Introdução.....43

2. Material e métodos.....45

2.1 Manutenção dos reprodutores.....46

2.2 Coleta de sêmen.....46

2.3 Delineamento experimental.....47

2.4 Caracterização espermática do sêmen fresco.....47

2.4.1 Análise subjetiva.....47

2.4.2 Morfologia espermática.....48

2.4.3 Morfometria dos espermatozoides.....49

2.4.4 Concentração espermática.....50

2.5 Criopreservação.....50

2.6 Caracterização espermática do sêmen criopreservado.....50

2.6.1 Morfologia espermática.....50

2.6.2 Parâmetros Cinéticos.....50

2.7 Estatística.....51

3. Resultados.....51

3.1 Sêmen fresco.....51
3.1.1 Morfologia espermática.....51
3.1.2 Morfometria dos espermatozoides.....52
3.1.3 Concentração espermática.....53
3.2 Pós descongelamento.....53
3.2.1 Morfologia espermática.....53
3.2.2 Cinética espermática.....54
4. Discussão.....55
5. Conclusão.....60
FINANCIAMENTO.....60
REFERÊNCIA.....61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS……67
ANEXO 1 - REPRODUCTIVE BIOLOGY – GUIDE FOR AUTHORS….68
ANEXO 2 - CERTIFICADO CEUA……..…….80
VITA……81

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Pogonias courbina* (Lacepède, 1803) pertence à família Sciaenidae, esses peixes são demersais e estuarinos, distribuídos ao longo do Rio de Janeiro, Brasil até o Golfo de San Matías, Argentina, sendo encontrados predominantemente na América do Sul (Azpelicueta *et al.,* 2019). Os Estuários atuam como uma importante área reprodutiva para *P. courbina*, onde adultos se concentram sazonalmente para reprodução e desova, aumentando temporariamente a abundância local da espécie (Macchi *et al.,* 2002; Santos *et al.,* 2016; Azpelicueta *et al*., 2019). Durante esse período de maior vulnerabilidade, a espécie, é explorada pela pesca desde o século XIX (Odebrecht, 2003). Como consequência, populações do sul e sudeste do Brasil, especialmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, apresentam sinais de sobrepesca ao longo das últimas décadas (Chao *et al*., 2015; De Almeida *et al*., 2024).

No Brasil, esta espécie apresenta um histórico de declínio populacional desde o início da década de 1980 (IBAMA/CEPERG, 2011; CTMFM, 2019; MAGyO, 2019), resultando no colapso do estoque e em uma recuperação considerada lenta nas últimas décadas (Chao *et al*., 2015; Haimovici e Cardoso, 2017; Machado *et al*., 2020). Esta espécie foi incluída na Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção do Ministério do Meio Ambiente como “Em Perigo”, resultando na proibição da sua captura no Brasil (MMA, 2014). Em 2019, a espécie também foi avaliada para a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN e classificada como “Vulnerável” (Haimovici *et al.,* 2020). Recentemente, a espécie foi incluída na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção na categoria “Criticamente em Perigo” (MMA, 2026).

Os crescentes estudos sobre *P. courbina* evidenciam o interesse científico e reforçam a necessidade de compreender aspectos relacionados à sua biologia e conservação. Nesse contexto, pesquisas têm caracterizado parâmetros reprodutivos, incluindo período reprodutivo, idade da primeira maturação e fecundidade (Macchi *et al.,* 2002; Haimovic *et al*., 2006; Santos e Velasco, 2021), investigando a conectividade genética entre populações (Azpilicueta *et al*., 2019;

Machado *et al.,* 2020; De Almeida *et al*., 2024), descrito características seminais de animais criados em cativeiro (Benato *et al.,* 2023) e a padronização do protocolo de criopreservação seminal (Benato *et al*., 2026). A viabilização da produção em cativeiro e a criopreservação são técnicas promissoras para estabelecer um banco de germoplasma, permitindo a conservação dos espermatozoides por tempo indeterminado e potencializando o manejo reprodutivo e conservação *ex situ* da espécie (Benato *et al.,* 2023).

Assim, este trabalho visa analisar as características espermáticas de *P. courbina* após um processo de criopreservação. Comparando indivíduos oriundos de um estoque de reprodutor e ambientes naturais. Essa análise busca desenvolver planos de manejo reprodutivo que possam ser adotados tanto para os animais de um estoque de reprodutor quanto selvagens, visando resultados satisfatórios na produção animal e na criação de um banco de germoplasma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pogonias courbina*

A miraguaia (*Pogonias courbina*) pertence à ordem Acanthuriformes, e é membro da família Sciaenidae (Nelson *et al.,* 2016). São peixes demersais, estando distribuídos ao longo das águas costeiras do Oceano Atlântico Sudoeste (Azpelicueta *et al*., 2019). Esta espécie foi revalidada com base em seu isolamento geográfico e nas diferenças morfológicas e moleculares em relação às populações de *Pogonias cromis* do Atlântico Norte, sendo *P. courbina* reconhecida como a única espécie do gênero distribuída ao longo do estado do Rio de Janeiro, Brasil até o sul do Golfo San Matías, na Argentina (Azpelicueta *et al*., 2019). Estes animais habitam estuários, baías e águas costeiras, sendo adaptados a suportar variações de salinidade e temperatura (Cervigón, 1993; Santos *et al*., 2016). No Brasil, é reconhecida como o maior Sciaenidae observado no estado do Rio Grande do Sul (Haimovici *et al*., 2006; Santos e Velasco, 2021).

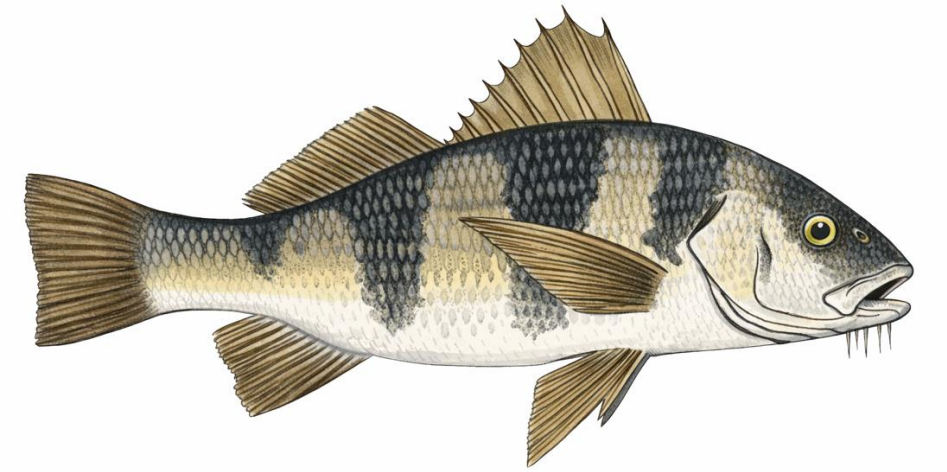


Figura 1. Exemplar de *Pogonias courbina* (Fonte: Autor).

Os animais apresentam coloração prateada, possuindo nos flancos quatro a cinco faixas escuras (Azpelicueta *et al*., 2019). São animais de grande porte podendo viver até os 55 anos e atingir 66 kg e 150 cm de comprimento total (Urteaga Jr *et al*., 2001; Haimovici *et al*., 2006; Haimovici *et al*., 2020). Sua dieta é composta principalmente por caranguejos e bivalves (Blasina *et al*., 2010). Na

época reprodutiva, as fêmeas apresentam desova múltipla, liberando oócitos em média a cada três ou quatro dias (Macchi *et al.,* 2002). Consequentemente, os peixes adultos realizam migrações e se concentram sazonalmente, formando agregados reprodutivos temporários (Macchi *et al.,* 2002; Santos *et al.,* 2016; Azpelicueta *et al*., 2019).

Na Argentina, a desova de *P. courbina* ocorre durante a primavera, entre outubro e dezembro, principalmente na região do Rio da Prata (Macchi et al., 2002). Nos estuários localizados no Brasil, as fêmeas desovam a primavera e o verão, com maior intensidade entre outubro e março (Haimovici, 1998). Nesse contexto, a espécie é explorada pela pesca desde o século XIX (Odebrecht, 2003). A pesca da *P. courbina* no Brasil atingiu seu auge entre as décadas de 50 e 70 (Chao *et al*., 2015), sendo posteriormente observado um declínio significativo de desembarque pesqueiro (Santos *et al*., 2016). A intensa exploração pesqueira levou a um quadro de sobrepesca (Chao *et al.,* 2015; Almeida *et al.,* 2024), e mesmo após a implementação de medidas restritivas à pesca, a recuperação populacional tem sido lenta, sobretudo devido à elevada vulnerabilidade da espécie durante o período reprodutivo (Haimovici e Cardoso, 2017).

Trabalhos como o de Haimovici *et al*. (2006) afirmam que a maturação reprodutiva se inicia entre os 4-5 anos de vida, porém, atualmente pesquisas apontam que a maturação reprodutiva se inicia quando os animais atinge 2,13 anos de vida (Santos e Velasco, 2021), apresentando uma tendência de redução na idade de maturação quando comparada a investigações anteriores realizadas (Macchi *et al.,* 2002; Haimovici *et al.,* 2006), o que sugere uma possível antecipação da maturidade reprodutiva em resposta à pressão pesqueira exercida sobre a população no ambiente natural.

Embora tenha sido observado um aumento dos desembarques em 2013, apenas indivíduos de pequeno e médio porte (28 a 62 cm) foram encontrados no interior do estuário (MPA, 2013; Santos *et al*., 2014; 2016), decorrência do colapso pesqueiro (Santos *et al.,* 2016). No trabalho de Santos e Velasco (2021) também foi observado a ausência de animais capturados com tamanho superior a 90 cm. Essa escassez de indivíduos de grande porte provavelmente está

associada ao seu maior valor agregado, que os torna alvos preferenciais da pesca, resultando em sua redução progressiva nos desembarques (Tsikliras e Polymeros, 2014; Santos e Velasco, 2021). Com a remoção contínua de reprodutores de maior porte do ambiente natural observa-se uma tendencia de antecipação da maturidade sexual, levando indivíduos mais jovens a ingressarem precocemente no processo reprodutivo, característica adicional que reforça o indicativo de sobre-exploração populacional (Santos e Velasco, 2021).

A *P. courbina* é considerada a espécie de Sciaenidae mais ameaçada do Atlântico Sudoeste (Azpelicueta *et al*., 2019). No Brasil, sua classificação como “Em perigo” ocorreu em 2014, onde o Ministério do Meio Ambiente (MMA) publicou a Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção, sendo a sua pesca proibida a partir desse momento em todo o território brasileiro (MMA, 2014). Posteriormente, em 2019, a espécie também foi avaliada para a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN e classificada como “Vulnerável” (Haimovici *et al.,* 2020).

Em 2025 o governo de Santa Catarina, Brasil, publicou a Portaria SAQ n°009/2025, buscando regulamentar a pesca estadual da espécie ao fixar o tamanho mínimo de captura em 55 cm. Entretanto, com a inclusão da espécie na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção na categoria “Criticamente em Perigo” (MMA, 2026), a portaria catarinense foi revogada e a sua atividade pesqueira proibida em todo território brasileiro.

Algumas legislações brasileiras ambientais e pesqueiras, como a Lei n° 6.938/1981, a Política Nacional de Pesca e Aquicultura (Lei N° 11.959/2009) e o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Ecossistemas Marinhos (PAN Marinho), estão alinhadas aos princípios de sustentabilidade e buscam harmonizar a exploração dos recursos pesqueiros com a conservação da biodiversidade (Souza *et al.,* 2020). Dentre as estratégias que podem ser utilizadas para tentar restabelecer a população de *P. courbina* na natureza, se destacam a conservação de gametas e o desenvolvimento de bancos de germoplasma (Magnotti *et al.,* 2018). Essas estratégias já foram empregadas com sucesso em diferentes espécies como o *Salmo salar* (Czerniawski *et al.,* 2011) e *Salmo trutta trutta L.* (Krepski e Czerniawski, 2019).

Uma das abordagens mais eficazes para conservar as populações de peixes é a aplicação da biotecnologia reprodutiva. A criopreservação é cada vez mais usada para a recuperação de espécies ameaçadas, com o desenvolvimento dessa biotécnica é possível diminuir a pressão sobre as populações selvagens, contribuindo para que a conservação de espécies e ao mesmo tempo garantindo a produção sustentável (Haimovici e Cardoso, 2017; Santos e Velasco, 2021; Benato *et al.,* 2023).

2.2 Criopreservação Espermática

A criopreservação é uma biotécnica que permite a conservação de amostras biológicas em temperaturas muito baixas, por um longo período. Essas condições proporcionam a preservação da microestrutura celular (Mazur, 1970; Sambu, 2015), permitindo assim a viabilidade das células e tecidos mesmo após o descongelamento, com uma perda mínima de eficiência (França *et al.,* 2024). A criopreservação de espermatozoides tem sido amplamente utilizada na produção animal, sendo aplicada para reduzir o número de reprodutores estocados na piscicultura, melhorar programas genéticos e conservar espécies ameaçadas (Streit Jr., 2013).

Na aquicultura, essa técnica otimiza o manejo em incubatórios, preserva os estoques naturais e mantém os genótipos selvagens, essenciais para a recuperação genética futura e a biodiversidade das espécies (Suquet *et al.,* 2000; Vandeputte, 2011), reduz os custos e riscos com o transporte de animais e previne a disseminação de doenças (Carneiro *et al*., 2012). A técnica também resolve problemas decorrentes a falta de sincronização reprodutiva entre machos e fêmeas, e aumenta a eficiência dos programas de melhoramento genético (Maria *et al*., 2009; Viveiros *et al*., 2009; Carneiro *et al*., 2012).

O desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen é crucial para programas de repovoamento e conservação (Vicente *et al.,* 2024). O primeiro sucesso com a criopreservação de sêmen de peixes foi no ano de 1953, com *Clupea harengus* (Blaxter, 1953). Com o decorrer do tempo, protocolos orientados para diferentes táxons foram desenvolvidos, principalmente em espécies que possuem altos valores econômicos agregados, como Salmonidae, Cyprinidae e Siluriformes (Tiersch e Green, 2011)

Essa biotécnica já é realidade em diversos países (Martínez-Páramo *et al*., 2016). Diversos estudos sobre criopreservação espermática de espécies de peixes marinhos que ocorrem em águas brasileiras já foram realizados (Magnotti *et al*., 2016), como *Centropomus undecimalis* (Tiersch *et al*., 2004), *Centropomus parallelus* (Tiba *et al*., 2009), *Epinephelus marginatus* (Cabrita *et al*., 2009), *Lutjanus analis* (Sanches *et al*., 2013), *Lutjanus synagris* (Sanches *et al*., 2015), *Menticirrhus americanus* (Nakayama, 2011) *Paralichthys orbignyanus* (Lanes *et al*., 2008), *P. courbina* (Benato *et al*., 2026) e *Rachycentron canadum* (Caylor *et al*., 1994).

Pesquisas sobre bancos de germoplasma de peixes abrangem diferentes células (Magnotti *et al.,* 2018), como espermatozoides (Da Costa *et a*l., 2024), espermatogônias (Silva *et al*., 2026), células germinativas primordiais (Yoshizaki *et al.,* 2011), oócitos (Residiwati *et al*., 2024) e embriões (Cabrita, *et al*., 2010). No entanto, devido ao pequeno tamanho e resistência dos espermatozoides, a criopreservação de sêmen é a biotécnica mais estabelecida em espécies aquáticas (Martínez-Paramo *et al.,* 2016).

O processo de criopreservação segue diversas etapas, desde a coleta de sêmen até o congelamento e, posteriormente, o descongelamento (Maria e Carneiro, 2012). A primeira etapa é a coleta, que varia conforme a espécie, seguida pela avaliação microscópica da qualidade espermática (Robles *et al.,* 2003). O sêmen é então misturado a um diluidor, cuja sua principal função é manter os espermatozoides em estado inativo, evitando a ativação da motilidade durante o processamento (Gwo, 2011), normalmente é utilizado uma composição salina (estabilizador de pH), pequena quantidade de açúcar (glicose, frutose, trealose) (Horváth *et al*., 2003; Varela Júnior *et al*., 2022), ou proteína (BSA - *bovine sérum albumin,* gema de ovo, leite em pó) (Adames *et al*., 2015; Magnotti *et al*., 2018), prioritariamente o diluidor deve ser estável ao longo do tempo e estéril (Magnotti *et al*., 2018).

Após essas etapas, geralmente são utilizados crioprotetores, cuja função é proteger as células contra danos causados pela variação extrema de temperatura, processo de congelamento e descongelamento, especialmente a formação de cristais de gelo intracelulares (Cabrita et al., 2005; Yoshizaki *et al.,*

2011; Streit Jr., 2013). Depois, o sêmen é armazenado em palhetas, criotubos ou cápsulas biodegradáveis e congelado em nitrogênio líquido (França *et al.,* 2023, 2024). Após essas etapas o sêmen é descongelado para a realização da fertilização e o monitoramento do desenvolvimento do embrião e da larva (Maria e Carneiro, 2012).

Tanto os diluentes quanto os crioprotetores afetam a eficácia da criopreservação. Os crioprotetores são responsáveis pela redução de criolesões decorrentes do processo de criopreservação (Jang *et al*., 2017), apresentam baixa toxicidade e devem ser bioaceitáveis (Pegg, 2007), sendo divididos em dois grupos: (i) permeáveis, que permeiam a membrana celular, geralmente atuam reduzindo a concentração de eletrólitos dentro e ao redor da célula (Jang *et al*., 2017), crioprotetores permeáveis como glicerol, propilenoglicol (1,2-propanodiol), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH), etilenoglicol (EG), metilglicol (2-metoxietanol) são comumente utilizados (Magnotti *et al*., 2016); e crioprotetores (ii) não-permeáveis, não possuem a capacidade de penetrar a membrana celular devido ao seu alto peso molecular, que protegem a membrana externa (Streit Jr., 2013 podendo ser açucares, como glicose, trehalose e sacarose (Carneiro *et al*., 2012), polímeros (Krausková et al., 2016), além de proteínas e lipoproteínas derivados da gema de ovo, e do leite bovino (Moraes *et al*., 1998; Acipreste *et al.,* 2014).

Os peixes formam o maior grupo de vertebrados, com cerca de 35 mil espécies descritas (FishBase, 2023). As especificidades de cada espécie influenciam diretamente o sucesso da criopreservação (Magnotti *et al*., 2016), uma vez que essa ampla diversidade biológica acarreta nas diferenças morfológicas e biológicas dos gametas masculinos (Gwo, 2011). Dessa forma, cada espécie pode apresentar particularidades seminais, como diferenças de morfologia e morfometria espermática, bem como na composição físico-química do plasma seminal (Gwo, 2011), influenciando diretamente a resposta dos espermatozoides aos danos decorrentes da criopreservação (resfriamento, congelamento e descongelamento) (Cabrita *et al.,* 2014).

Para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação, a escolha do diluente é considerada um dos primeiros passos fundamentais, pois sua função

envolve o fornecimento de suporte energético e proteção química aos espermatozoides, contribuindo para a manutenção da viabilidade celular (Magnotti *et al*., 2016). Dominar os hábitos reprodutivos das espécies é fundamental (Magnotti *et al*., 2016), visto que o processo de ativação dos gametas é variável, sendo que em espécies de água doce, um meio hipo-osmótico ativa os gametas; enquanto em espécies marinhas o meio hiper-osmótico desempenha esse papel (Takai e Morisawa, 1995; Murgas *et al*., 2011).

Os protocolos de criopreservação devem ser adaptados para cada espécie (Murgas *et al.,* 2007; Tiersch *et al.,* 2007; Magnotti *et al*., 2016), fato demonstrado pela grande variedade de metodologias empregadas, envolvendo distintos tempos de equilíbrio, diluentes e crioprotetores permeáveis e não permeáveis (Streit Jr *et al*., 2025; Benato *et al*., 2026). Há estudos que reúnem informações sobre diluentes e crioprotetores em peixes de água doce e salgada (Martínez-páramo *et al*., 2016; Magnotti *et al*., 2018), mas ainda há escassez de estudos que detalhem a aplicação prática desses protocolos em conservação e aquicultura (Benson *et al.,* 2013; Kása *et al.,* 2014).

2.3 Análises de qualidade espermática

A avaliação da qualidade espermática é fundamental para os processos de reprodução *in vitro* e para formação de bancos de germoplasma (Magnotti *et al*., 2016; Costa *et al*., 2024). Essas análises permitem monitorar a viabilidade celular e otimizar o uso do sêmen em programas de reprodução assistida. Como a principal função dos espermatozoides é transportar e transmitir o material genético à prole (Cabrita *et al*., 2022; França *et al*., 2024), sua qualidade está diretamente relacionada ao sucesso da fertilização, ao desenvolvimento embrionário e à produção de larvas saudáveis (Rurangwa *et al*., 2004).

Para essa finalidade, diversas biotécnicas e metodologias têm sido desenvolvidas para avaliar diferentes aspectos da funcionalidade espermática (Hezavehei *et al.,* 2018). Em peixes, o sucesso reprodutivo e a capacidade de fertilização dependem tanto da quantidade de sêmen disponível, quanto da qualidade, incluindo parâmetros como viabilidade, morfologia, estabilidade da membrana e integridade do DNA (Kowalski e Cejko, 2019). Dessa forma,

qualquer característica quantificável que se correlacione diretamente com o sucesso da fertilização pode ser utilizada como um biomarcador de qualidade espermática (Magnotti *et al*., 2016), incluindo osmolaridade, pH e composição química do plasma seminal (Sanchez *et al*., 2024), atividade enzimática e a concentração de adenosina trifosfato (ATP) (Boryshpolets et al., 2009), anormalidades morfológicas e morfometria espermática (Gallego e Asturiano, 2018; Gallego *et al*., 2018; Costa et al., 2024)

Além da motilidade espermática, que é um dos principais parâmetros utilizados na avaliação da qualidade seminal em peixes (Cosson *et al.,* 2008; Kowalski e Cejko, 2019). Esses parâmetros permitem compreender melhor os mecanismos que afetam os espermatozoides, auxiliam no controle de fatores que influenciam a qualidade dos gametas (Cabrita *et al*., 2014), facilitam a seleção de indivíduos que possuem características seminais desejadas (Magnotti *et al*., 2022) e constituem uma ferramenta importante em estudos voltados à conservação de espécies ameaçadas (Kowalski e Cejko, 2019).

2.4 Análise cinética espermática computadorizada (CASA)

A capacidade de deslocamento dos espermatozoides é fundamental para o processo de fertilização, pois permite que as células alcancem o oócito e realizem a fecundação (Figueroa *et al*., 2016). Dessa forma, grande parte da atividade fisiológica dos espermatozoides está diretamente associada à motilidade (Cosson, 2019). Diversos estudos demonstram que a porcentagem de espermatozoides móveis apresenta forte relação com o sucesso da fertilização em diferentes espécies de peixes (Figueroa *et al.,* 2015; Kowalski e Cejko, 2019; Neumann *et al.,* 2019). A eficiência da motilidade depende de fatores fisiológicos como o funcionamento das mitocôndrias, produção de ATP, integridade dos canais da membrana plasmática e estrutura do flagelo (Figueroa *et al.,* 2015).

Tradicionalmente, a avaliação da motilidade é realizada por meio de análise subjetiva da porcentagem de células móveis (Kowalski e Cejko, 2019), na qual uma pequena amostra de sêmen é observada em microscópio óptico, permitindo ao avaliador estimar visualmente a proporção de espermatozoides

móveis em uma escala de 0 a 100% (Taitson *et al*., 2008). Essa abordagem apresenta a vantagem de ser simples, rápida e de baixo custo, sendo amplamente utilizada em estudos de reprodução de peixes e em avaliações preliminares de qualidade seminal.

Como esperado, essas medições podem apresentar grande variabilidade entre observadores (Verstegen *et al*., 2002). A avaliação subjetiva da motilidade depende diretamente da experiência do avaliador e de diferentes aspectos da observação microscópica, podendo resultar em estimativas superestimadas ou subestimadas da proporção de espermatozoides móveis, além disso, esse tipo de avaliação se limita principalmente à estimativa da porcentagem de espermatozoides móveis e da duração da motilidade (Gallego *et al*., 2018).

Outros fatores também podem influenciar a interpretação da motilidade, como a densidade espermática, a velocidade de natação dos espermatozoides e a deriva celular durante a observação microscópica (Rurangwa *et al*., 2004). Dessa forma, a avaliação subjetiva pode apresentar maior variabilidade entre análises, o que pode dificultar a comparação direta de resultados entre diferentes laboratórios (Verstegen *et al*., 2002; Rosenthal *et al*., 2010). Nesse contexto, a necessidade de avaliações mais objetivas, precisas e reprodutíveis, impulsionou o desenvolvimento da análise cinética espermática computadorizada (*Computer-Assisted Sperm Analysis* - CASA).

Dentre as metodologias utilizadas para a avaliação da qualidade seminal, a análise CASA permite avaliar parâmetros objetivos relacionados à eficiência reprodutiva dos peixes, como a taxa de motilidade e as velocidades de deslocamento dos espermatozoides (Rurangwa *et al.,* 2004). Utiliza-se um computador equipado com software de imagem (Rurangwa *et al.,* 2004), esse sistema se refere a um equipamento físico que é utilizado para visualizar e digitalizar imagens estáticas e dinâmicas de espermatozoides. (Boyer *et al*., 1989).

Os primeiros sistemas de análise espermática computadorizada foram desenvolvidos na década de 1980, inicialmente aplicados em mamíferos, e posteriormente adaptados para avaliação de gametas de peixes (Gallego e

Asturiano, 2018). Desde então, a técnica tem sido amplamente utilizada em pesquisas envolvendo fisiologia reprodutiva, conservação de sêmen, manejo de reprodutores, competição espermática, ecotoxicologia e biologia reprodutiva de diferentes espécies (Gallego e Asturiano, 2018). Com o passar das décadas, e o avanço dos sistemas de captura e processamento de imagem, o CASA consolidou-se como uma ferramenta amplamente utilizada na avaliação da qualidade espermática em peixes, permitindo a obtenção de dados quantitativos com maior precisão, padronização e reprodutibilidade quando comparado às avaliações subjetivas (Cabrita *et al.,* 2014).

Através dessa análise, é possível determinar diversos parâmetros cinéticos relacionados ao padrão de natação dos espermatozoides. Entre os principais parâmetros avaliados, estão a porcentagem de motilidade (MOT, %), que representa a proporção de células móveis em relação ao total de espermatozoides observados. Além desse parâmetro, o sistema também permite avaliar diferentes velocidades de deslocamento espermático relacionados ao padrão de natação das células. Entre elas destaca-se a motilidade progressiva (PROG, %), que é a proporção de espermatozoides exibindo deslocamento efetivo em trajetória progressiva.

Também são mensurados diferentes velocidades de deslocamento da cabeça espermática, incluindo a velocidade média do deslocamento (VAP, $\mu m.s^{-1}$), que mede a cabeça do espermatozoide ao longo de sua trajetória média espacial; a velocidade curvilinear (VCL, $\mu m.s^{-1}$), que é a velocidade média da cabeça do espermatozoide através de seu caminho real e geralmente apresenta o maior valor numérico entre as velocidades avaliadas; e a velocidade em linha reta (VSL, $\mu m.s^{-1}$), que corresponde à velocidade ao longo da menor distância entre o ponto inicial e final da trajetória, normalmente apresentando os menores valores entre os parâmetros de velocidade.

O sistema CASA também permite avaliar os parâmetros ligados a oscilação da cabeça espermática. Entre eles, a linearidade do movimento (LIN, %), que expressa o grau de linearidade do movimento, sendo definida pela razão entre VSL e VCL (VSL/VCL); índice de oscilação (WOB, %), calculado pela razão entre VAP e VCL (VAP/VCL), que descreve a oscilação da trajetória real em

torno da trajetória média; e a retilinearidade (STR, %), que indica o grau de alinhamento entre trajetória média e a trajetória linear.

Outros parâmetros importantes incluem a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), que representa o desvio lateral da cabeça espermática em relação a trajetória média, e a frequência de batimento (BCF, Hz) que indica o número de vezes que a trajetória da cabeça cruza a trajetória média, refletindo a frequência do batimento flagelar (Kowalski e Cejko, 2019).

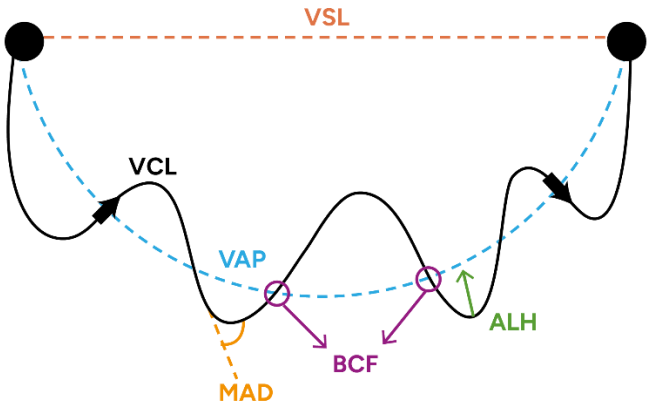


Figura 2. Esquema que demonstra os parâmetros analisados e estimados pelo software CASA. Os círculos pretos representam as posições sucessivas da cabeça do espermatozoide durante a gravação do vídeo. VCL – velocidade curvilínea; VAP – velocidade média do caminho; VSL – Velocidade em linha reta; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência do batimento de cauda. MAD: deslocamento angular médio. **Fonte:** Adaptado de Kowalski e Cejko (2019).

2.5 Análise da morfologia, morfometria e concentração espermática

A avaliação da morfologia espermática pode ser realizada por diferentes técnicas, incluindo microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, softwares especializados para análise espermática, como o ASMA, têm sido utilizados para auxiliar na identificação e quantificação de anormalidades celulares; para a análise morfológica em microscopia óptica, diferentes corantes podem ser empregados após a fixação das amostras em formol salino tamponado, sendo o corante Rosa de Bengala amplamente usado em estudos com peixes (Streit Jr *et al.,* 2004). A análise morfológica constitui uma ferramenta essencial na avaliação da

qualidade espermática, pois permite inferências sobre o potencial de fertilização de amostras de sêmen fresco ou criopreservado, além de auxiliar na identificação de possíveis causas de falhas reprodutivas em peixes considerados aptos à reprodução (Miliorini, 2011).

As anormalidades morfológicas dos espermatozoides podem ter diferentes origens. Algumas estão associadas ao processo de espermatogênese, enquanto outras são relacionadas ao ambiente e ao manejo de animais, diversos outros fatores podem influenciar a ocorrência dessas alterações, como condição nutricional, estágio de maturação gonadal, idade do animal, método de coleta, preparação das amostras e o próprio processo de congelamento durante a criopreservação (Miliorini *et al*., 2011; Costa *et al*., 2019). Fatores genéticos, doenças, estresse, exposição a substâncias tóxicas também podem contribuir para o aumento das anormalidades espermáticas (Billard *et al.,* 1995).

Estudos indicam que fatores ambientais, como a presença de poluentes e toxinas, podem influenciar negativamente a morfologia dos espermatozoides (Rurangwa *et al*., 2004; Alavi *et al*., 2021). Da mesma forma, variações na temperatura da água, alterações da composição iônica por meio e o tipo de crioprotetores utilizado durante o processo de criopreservação, podem afetar a integridade estrutural e funcional das células espermáticas, impactando a morfologia e qualidade final dos espermatozoides (Viveiros *et al.,* 2020).

Alguns autores classificam as anormalidades espermáticas em primárias e secundárias. As anormalidades primarias são aquelas originadas durante o processo de espermatogênese, enquanto as secundarias estão associadas ao manejo reprodutivo, manipulação do sêmen ou procedimentos laboratoriais (Streit Jr. *et al*., 2009). Além dessa classificação, também podem ser descritas como anormalidades maiores ou menores, compensatórias ou não compensatórias, e ainda classificadas quanto à gravidade das alterações estruturais (Miliorini *et al.,* 2010)

As anormalidades da cabeça do espermatozoide podem representar um problema significativo, uma vez que cada espécie de peixe apresenta

características específicas na micrópila dos oócitos que permitem a passagem dos espermatozoides para fertilização (Benato *et al.,* 2023). Alterações no tamanho ou formato da cabeça podem comprometer a estrutura e a função celular, podendo estar associadas a danos na integridade do DNA, alterações mitocondriais, deficiência metabólica e desintegração da membrana plasmática. Essas alterações podem tornar a célula menos hidrodinâmica, afetando negativamente a motilidade e os parâmetros cinéticos do movimento espermático (Costa *et al.*, 2022) além de comprometer o seu potencial de fertilização (Pšenička *et al.,* 2008). Por outro lado, as anormalidades da cauda podem alterar o deslocamento celular e os parâmetros cinéticos relacionados à movimentação do espermatozoide (Benato *et al.,* 2023). Alterações estruturais nessa região podem modificar o padrão de oscilação e movimento flagelar, reduzindo a progressividade das células e, consequentemente, diminuindo o sucesso reprodutivo (Billard *et al.,* 1995; Rurangwa *et al.,* 2004; Viveiros *et al.,* 2020).

De acordo com Marques (2001), o grau de anormalidades morfológicas pode afetar diretamente o potencial de fertilização. Nesse contexto, a morfologia e a motilidade dos espermatozoides são considerados alguns dos parâmetros mais importante da biologia reprodutiva dos peixes (Boryshpolets *et al*., 2013). Além disso, características morfológicos, como a forma e tamanho dos espermatozoides, desempenham um papel crucial na motilidade dos espermatozoides após a ativação, sendo a motilidade é um fator crucial para o sucesso da fertilização (Figueroa *et al.,* 2016). Estudos recentes, demonstram que o aumento da frequência das anormalidades espermáticas pode reduzir a velocidade do movimento espermático e causar alterações em parâmetros cinéticos, comprometendo o desempenho reprodutivo (Benato *et al*., 2023).

A avaliação da morfometria espermática pode ser realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura ou, mais recentemente, com auxílio de software específicos de análise de imagem. Entretanto, possíveis distorções na morfologia espermática decorrentes do preparo das amostras, como técnicas de fixação e coloração, podem influenciar as medidas morfométricas obtidas (Gallego *et al.,* 2012). A morfometria dos espermatozoides tem sido amplamente

utilizada para investigar as relações entre a forma e a função celular em condições naturais de fertilização.

A variação no tamanho dos espermatozoides dentro de uma população de peixes também pode fornecer informações importantes sobre estratégias reprodutivas da espécie (Benato *et al.,* 2023). Gage *et al*. (2004) demonstram que variações no comprimento dos espermatozoides podem influenciar diretamente sua sobrevivência e eficiência reprodutiva, podendo também refletir em uma relação entre velocidade de movimento e longevidade espermática. Em mamíferos, por exemplo, a morfometria da cabeça espermática tem sido correlacionada com taxas de fertilização (Aziz *et al.,* 1998). Em peixes, essas análises também têm sido utilizadas no desenvolvimento e otimização de protocolos de criopreservação (Asturiano *et al.,* 2007).

A concentração de espermatozoides também é frequentemente utilizada como indicador da qualidade seminal, sendo correlacionada com o sucesso da fertilização. A determinação da concentração geralmente é realizada pela contagem de células em um volume conhecido de sêmen, utilizando hemocitômetros, câmara de Neubauer ou qualquer outra câmara contrária e um microscópio de contraste de fase (Robles *et al.,* 2003). Antes da contagem, o sêmen deve ser diluído a uma taxa pré-estabelecida para obter uma concentração adequada de células no campo de observação.

A viscosidade do sêmen pode dificultar a obtenção de uma diluição homogênea da amostra, o que pode resultar em variações nas contagens realizadas a partir de diferentes alíquotas da mesma amostra (Cabrita *et al.,* 2009). Por esse motivo, recomenda-se a realização de múltiplas leituras, valores muito extremos devem ser descartados e a média das análises deve ser tomada como resultado. Embora esse método seja amplamente utilizado, ele pode ser relativamente demorado e sujeito à variabilidade entre observadores. Dessa forma, métodos alternativos têm sido propostos, como o uso de contadores eletrônicos de partículas, como o contador Coulter (Cabrita *et al.,* 2001). Outra abordagem consiste na estimativa da concentração espermática por meio da densidade óptica do sêmen, usando um espectrofotômetro, conforme descrito por Ciereszko e Dabrowski (1993), considerado mais rápido e reprodutível.

3. Hipótese

A origem dos reprodutores (selvagem ou de um estoque de reprodutor) influencia a resposta espermática ao processo de criopreservação, resultando em diferenças na qualidade seminal pós-descongelamento.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de um protocolo de criopreservação espermática em *Pogonias courbina*, comparando a qualidade seminal pós-descongelamento entre reprodutores de origem selvagem e de um estoque de reprodutor.

4.2 Objetivo Específicos

Avaliar a qualidade do sêmen criopreservado de animais de origem selvagens e de um estoque de reprodutor: avaliar morfologia espermática, avaliar morfometria dos espermatozoides, determinar a concentração espermática e avaliar os parâmetros cinéticos espermáticos por meio de sistema CASA.

5. REFERÊNCIAS

ADAMES, M. S. *et al.* Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science*, v. 161, p. 119-128, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014.

ALAVI, S. M.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004.

ALAVI, S. M. H. *et al.* A review on environmental contaminants-related fertility threat in male fishes: effects and possible mechanisms of action learned from wildlife and laboratory studies. *Animals*, v. 11, n. 10, e2817, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ani11102817.

ACIPRESTE, A. C. *et al.* Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. Ciência Animal Brasileira, v. 15, n 1, p.107-114, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.26124

ALMEIDA, P. R. C. *et al.* Population structure and habitat connectivity of *Pogonias courbina* (Perciformes, Sciaenidae) in two Brazilian lagoon systems on south-east coast of Rio de Janeiro, Brazil, inferred from otolith shape and elemental signatures. *Journal of Sea Research*, v. 199, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.seares.2024.102500.

ASTURIANO, J. F. *et al.* Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 162-166, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00746.x.

AZIZ, N. *et al.* Human sperm head morphometric distribution and its influence on human fertility. *Fertility and Sterility*, v. 70, n. 5, p. 883-891, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00317-3.

AZPELICUETA, M. del M. *et al.* Morphology and molecular evidence support the validity of *Pogonias courbina* (Lacepède, 1803) (Teleostei: Sciaenidae), with a redescription and neotype designation. *Plos ONE*, v. 14, n. 6, e0216280, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216280.

BENATO, J. L. *et al.* A stepwise methodology for developing fish sperm cryopreservation protocols: application to the endangered *Pogonias courbina*. *Cryobiology*, v. 123, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105604.

BENATO, J. L. *et al. Pogonias courbina* sperm characteristics in its first reproductive season. *PeerJ*, v. 11, e15600, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.7717/peerj.15600.

BENSON, E. E. *et al.* Translating cryobiology principles into trans-disciplinary storage guidelines for biorepositories and biobanks: a concept paper. *CryoLetters*, v. 34, n. 3, p. 277-312, 2013.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Développement*, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.

BILLARD, R. *et al.* Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, v. 129, n. 1-4, p. 95-112, 1995.

BIRKELAND, C; DAYTON, P. K. The importance in fishery management of leaving the big ones. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 20, n. 7, p. 356-358, 2005

BORYSHPOLETS, S. *et al.* Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality. *Theriogenology*, v. 72, n. 6, p. 851-859, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.005.

BORYSHPOLETS, S. *et al.* Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, v. 80, n. 7, p. 758-765, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.019.

BOYER, S. P. *et al*. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility*, v. 12, p. 165-200, 1989.

BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, v. 172, n. 4391, p. 1189-1190, 1953.

BRASIL. Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2 set. 1981. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938.htm.

BRASIL. Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009. Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 jun. 2009. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/lei/l11959.htm.

CABRITA, E. *et al*. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, v. 432, p. 389-401, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034.

CABRITA, E. *et al*. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, v. 201, n. 3-4, p. 301-314, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00636-6.

CABRITA, E. *et al*. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 mL macrotubes. *Cryobiology*, v. 50, n. 3, p. 273-284, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.02.002.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M. P. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. Boca Raton: CRC Press, 2009.

CABRITA, E. *et al*. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, v. 287, n. 1-2, p. 152-157, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.035.

CAYLOR, R. E.; BIESIOT, P. M.; FRANKS, J. S. Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture*, v. 125, n. 1-2, p. 81-92, 1994. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90158-9.

CHAO, N. L. *et al*. A popular and potentially sustainable fishery resource under pressure: extinction risk and conservation of Brazilian Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). *Global Ecology and Conservation*, v. 4, p. 117-126, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.06.002.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, v. 109, n. 3-4, p. 367-373, 1993. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90175-X.

COSSON, J. *et al*. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, v. 136, n. 3, p. 277-294, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1530/REP-07-0522.

COSSON, J. Fish sperm physiology: structure, factors regulating motility, and motility evaluation. In: *Biological Research in Aquatic Science*. London: IntechOpen, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.5772/intechopen.85139.

COMISIÓN TÉCNICA MIXTA DEL FRENTE MARÍTIMO (CTMFM). Archivos de captura. 2019. Disponível em: http://ctmfm.org/archivos-de-captura/. Acesso em: 04 maio 2025.

CZERNIAWSKI, R.; PILECKA-RAPACZ, M.; DOMAGAŁA, J. Stocking experiment with Atlantic salmon and sea trout parr reared on either live prey

or a pellet diet. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 27, n. 4, p. 984-989, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01761.x.

COSTA, B. B. *et al*. Characterization of sperm quality in *Brycon hilarii*: how does morphology affect sperm movement? *Theriogenology Wild*, v. 1, 100007, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.therwi.2022.100007.

COSTA, B. B. *et al*. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 35, n. 4, p. 987-993, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1111/jai.13928.

COSTA, B. B.; LASSEN, P. G.; STREIT JR., D. P. Cryopreservation-induced morphological changes in freshwater fish sperm: a systematic review. *Biopreservation and Biobanking*, v. 22, n. 5, p. 416-427, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1089/bio.2023.0008.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Fish sperm quality assessment. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, n. 5, p. 636-643, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x.

FAUVEL, C. *et al*. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, v. 54, n. 2, p. 356-369, 1999. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00835.x.

FIGUEROA, E. *et al*. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, v. 83, n. 2, p. 238-245, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.017.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J. G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, v. 47, n. 6, p. 1697-1708, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1111/are.12629. *FISHBASE.* Fish species database. Disponível em: https://www.fishbase.org. Acesso em: 9 out. 2023.

FRANÇA, T. S. *et al*. Successful cryopreservation in biodegradable containers of sperm from aquaculture Mediterranean fishes. *Theriogenology*, v. 216, p. 53-61, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.016.

GAGE, M. J. G. *et al*. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology*, v. 14, n. 1, p. 44-47, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.028.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 6, p. 820-832, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1071/RD17460.

GALLEGO, V. *et al*. Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology*, v. 79, n. 7, p. 1034-1040, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.021.

GALLEGO, V. *et al*. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 5, p. 1457-1467, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10695-018-0505-1.

GALLEGO, V. *et al*. Comparison of two techniques for the morphometry study on gilthead seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa and evaluation of changes induced by cryopreservation. *Theriogenology*, v. 77, n. 5, p. 1078-1087, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.027

GWO, J. C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (ed.). *Cryopreservation in aquatic species*. 2. ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 459-481.

HAIMOVICI, M.; CARDOSO, L. G. Long-term changes in the fisheries in the Patos Lagoon estuary and adjacent coastal waters in southern Brazil. *Marine Biology Research*, v. 13, n. 1, p. 135-150, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1228978.

HAIMOVICI, M. *et al*. *Pogonias courbina*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2020: e.T159145751A159145756, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T159145751A159145756.en

HAIMOVICI, M. *et al*. Diagnóstico da pesca no litoral do estado do Rio Grande do Sul. In: *ISAAC, V. J. et al. (org.). A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais*. Belém: Editora Universitária da UFPA, 2006. p. 157-180.

HEZAVEHEI, M. *et al*. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012.

HORVÁTH, Á.; MISKOLCZI, E.; URBÁNYI, B. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, v. 16, n. 5, p. 457-460, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0990-7440(03)00084-6.

IBAMA/CEPRG. *Desembarque de pescados no Rio Grande do Sul: 2009*. Rio Grande, 2011.

ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*, v. 49, n. 2, p. 114-122, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.06.001.

JANG, T. H. *et al*. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001.

KÁSA, E. *et al*. Vitrification of the sperm of European eel (*Anguilla anguilla*): investigation of different protocols. In: *AQUACULTURE EUROPE 2014*, 2014, San Sebastián. *Book of Abstracts*. San Sebastián: European Aquaculture Society, 2014. p. 616-617.

KOWALSKI, R. K.; CEJKO, B. I. Sperm quality in fish: determinants and affecting factors. *Theriogenology*, v. 135, p. 94-108, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009.

KRAUSKOVÁ, L. *et al*. Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 509, n. 1-2, p. 41-49, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.031.

KREPSKI, T.; CZERNIAWSKI, R. Can we teach a fish how to eat? The impact of bottom and surface feeding on survival and growth of hatchery-reared sea trout parr (*Salmo trutta trutta* L.) in the wild. *PLOS ONE*, v. 14, n. 9, e0222182, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222182.

LANES, C. F. C. *et al*. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, v. 275, n. 1-4, p. 361-365, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.005.

LINHART, O. *et al*. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology*, v. 51, n. 3, p. 250-261, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.005.

MACCHI, G. J.; ACHA, E. M.; LASTA, C. A. Reproduction of black drum (*Pogonias cromis*) in the Río de la Plata estuary, Argentina. *Fisheries Research*, v. 59, n. 1-2, p. 83-92, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0165-7836(01)00410-6.

MACHADO, R. C. *et al*. Genetic connectivity of black drum (*Pogonias courbina*) stocks in the southwestern Atlantic Ocean. *Environmental Biology of Fishes*, v. 103, n. 8, p. 913-926, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10641-020-00993-6.

MAGNOTTI, C. *et al*. Spermatological characteristics and effects of cryopreservation in Lebranche mullet spermatozoa (*Mugil liza* Valenciennes, 1836): first report of ultra-rapid freezing. *Animal Reproduction Science*, v. 241, 106986, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106986.

MAGNOTTI, C. *et al*. 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. Disponível em: https://doi.org/10.1111/raq.12145.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA (MAGYP). Desembarques. 2019. Disponível em: http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/pesca_maritima/desembarques/. Acesso em: 27 agosto 2024.

MARIA, A.; CARNEIRO, P. Fish semen cryopreservation in Brazil: state of the art and future perspectives. *Ciência Animal*, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARQUES, L. C. Avaliação de anormalidades morfológicas em sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 1, p. 45-52, 2001.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al*. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, v. 472, p. 156-177, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v. 168, n. 3934, p. 939-949, 1970. Disponível em: https://doi.org/10.1126/science.168.3934.939.

MILIORINI, A. B. *et al*. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*, v. 42, n. 2, p. 177-187, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02617.x.

MORAES, C. N. *et al*. Ethylene glycol for freezing ram semen in pellets. *Ciência Rural*, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Reconhece as espécies de peixes e invertebrados aquáticos da fauna brasileira ameaçadas de extinção. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 dez. 2014. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2014/p_mma_445_2014_lista_peixes_amea%C3%A7ados_extin%C3%A3o.pdf. Acesso em: 25 agosto 2024.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRA, G. J. M. Cryopreservation of curimba (*Prochilodus lineatus*) semen after addition of different diluters, activators and cryoprotectants. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000300002.

MURGAS, L. D. S. *et al*. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.

NAKAYAMA, C. L. Reprodução induzida e criopreservação do sêmen de papa-terra (*Menticirrhus americanus*) (Perciformes: Sciaenidae). 2011. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. *Animal Reproduction Science*, v. 201, p. 84-92, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.010.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. *Fishes of the World*. 5. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.

NIELAND, D. L.; WILSON, C. A. Reproductive biology and annual variation of reproductive variables of black drum in the northern Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 122, n. 3, p. 318-327, 1993.

ODEBRECHT, C. *A Lagoa dos Patos no século XIX na visão do naturalista Hermann von Ihering*. Rio Grande: Ecoscientia, 2003.

PETERS, K. M.; McMICHAEL JR., R. H. Early life history of the black drum *Pogonias cromis* (Pisces: Sciaenidae) in Tampa Bay. *Florida Scientist*, v. 11, n. 1, p. 39-58, 1990. Disponível em: https://doi.org/10.18785/negs.1101.05.

PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1055/s-2002-23515.

PŠENIČKA, M. *et al*. Structural abnormalities of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 4, p. 591-597, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10695-008-9285-3.

ROBLES, V. *et al*. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture*, v. 224, p. 203-212, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00221-7.

RODRIGUES, R. *et al*. Mitochondrial DNA reveals population structuring in *Macrodon atricauda* (Perciformes: Sciaenidae): a study covering the whole geographic distribution of the species in the southwestern Atlantic. *Mitochondrial DNA*, v. 25, p. 150-156, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.3109/19401736.2013.792053.

RURANGWA, E. *et al*. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v. 234, p. 1-28, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006.

ROSENTHAL, H. *et al*. On the biology of fish gametes: summary and recommendations of the Second International Workshop, Valencia, Spain,

2009. *J. Appl. Ichthyol.*, v. 26, p. 621-622, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01550.x.

SAMBU, S. A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. *PeerJ*, v. 3, e1039, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.7717/peerj.1039.

SANCHES, E. *et al*. Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Biology*, v. 75, n. 3, p. 662-669, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1519-6984.20613.

SANCHES, E. G. *et al*. Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 85, p. 1083-1092, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000047.

SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). *Boletim Instituto de Pesca*, v. 35, n. 3, p. 389-399, 2009.

SANCHEZ, M. P. *et al.* Relationship between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the catfish *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Neotrop. Ichthyol.*, v. 22, n. 2, e230109, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0109.

SANTOS, P. R.; EINHARDT, C. M. C.; VELASCO, G. A pesca artesanal da miragaia (*Pogonias cromis*, Sciaenidae) no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 42, p. 89-101, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n1p89.

SANTOS, P. R. S.; VELASCO, G. Reduction of reproductive parameters of *Pogonias courbina* (Perciformes, Sciaenidae) in southern Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 41, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101590.

SERRALHEIRO, P. C. S. *et al.* Criopreservação de sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860: pH de meios crioprotetores, concentrações de crio-aditivo e de diluente, velocidades de congelamento e taxa de fertilização. In: *Congresso Da Sociedade Brasileira De Aquicultura E Biologia Aquática, Vitória*. *Anais*..., p. 205, 2004.

SERRALHEIRO, P. C. S. *et al.* Sperm cryopreservation of the fat snook *Centropomus parallelus* Poey, 1860. In: *World Aquaculture*, Salvador, p. 716, 2003.

SOUZA, L. D.; PEREIRA, T. F.; MACHADO, P. M**.** Políticas públicas de conservação marinha no Brasil. *Revista Brasileira de Políticas Ambientais*, v. 16, p. 79-92, 2020.

STREIT JR., D. P. *et al.* Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós-criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.

STREIT JR., D. P. *et al.* Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.25110/arqvet.v7i2.2004.82.

STREIT JR., D. P. *et al.* A Systematic Review of *Brycon* Genus Sperm Cryopreservation Protocols: Challenges on Ex-Situ Conservation for Sustainable Aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 17, n. 4, e70064, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1111/raq.70064.

STREIT JR., D. P. *et al.* Germplasm banking and its role on development of the genetic improvement program for fish in Brazil. *4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes*, Albufeira, Portugal, p. 140-141, 2013.

SUQUET, M. *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, v. 31, n. 3, p. 231-243, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. *Animal Reproduction Science*, v. 105, n. 3-4, p. 283-291, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.009.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K+ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J. Cell Sci.*, v. 108, p. 1175-1181, 1995.

TIBA, R. M. *et al.* Diluentes e proporções sêmen:diluente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 35, n. 1, p. 99-110, 2009.

TIERSCH, T. R. Introduction to the Second Edition. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Eds.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2. ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, p. 1-17, 2011.

TIERSCH, T. R. *et al.* Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*, v. 65, p. 493-507, 2007.

TIERSCH, T. R. *et al.* Cryopreservation of sperm from the endangered Colorado pikeminnow. *North American Journal of Aquaculture*, v. 66, n. 1, p. 8-14, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1577/C02-043.

TSIKLIRAS, A. C.; POLYMEROS, K. Fish market prices drive overfishing of the ‘big ones’. *PeerJ*, v. 2, e638, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.7717/peerj.638.

URTEAGA, J. R.; PERROTTA, R. G. Estudio preliminar de la edad, el crecimiento, área de distribución y pesca de la corvina negra, *Pogonias cromis* (Linnaeus, 1766) en el litoral de la provincia de Buenos Aires. *Informe Técnico INIDEP*, n. 43, p. 1-22, 2001.

VAN DER WALT, L. D.; VAN DER BANK, F. H.; STEYN, G. J. The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 106, p. 313-318, 1993. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90533-8.

VANDEPUTTE, M. Selective Breeding – Lessons learned from terrestrial animals and status of aquaculture implementation. In: *Aquaculture Europe 2011 – European Aquaculture Society Annual Meeting*, Rhodes, Greece, 2011.

VARELA JUNIOR, A. S. *et al.* Trehalose in extenders for cryopreservation of *Colossoma macropomum* sperm. *CryoLetters*, v. 43, n. 5, p. 264-268, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.54680/fr22510110312.

VICENTE, J. D.; SENN, A. P.; AMARAL, V. L. L. Protocolos de criopreservação seminal: uma revisão integrativa. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 7, n. 5, e73377, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.34119/bjhrv7n5-345.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Seminal plasma features of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus* throughout two consecutive spawning seasons. *Molecular Reproduction and Development*, v. 86, n. 7, p. 776-785, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1002/mrd.23170.

WAYMAN, W. R.; THOMAS, R. G.; TIERSCH, T. R. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, v. 47, n. 8, p. 1519-1529, 1997. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00158-1.

YOSHIZAKI, G. *et al.* Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 6, n. 1, p. 55-61, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cbd.2010.09.003.

Manuscrito

*Artigo elaborado conforme as normas do periódico Reproductive Biology

Qualidade seminal pós-criopreservação em *Pogonias courbina*: Origem dos reprodutores para conservação *ex situ*

Resumo

A miraguaia, *Pogonias courbina*, é uma espécie demersal da família Sciaenidae distribuída ao longo da costa da América do Sul, cujo estoque natural brasileiro é considerado colapsado e atualmente classificado como “Em Perigo”. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um protocolo de criopreservação espermática para *P. courbina* selvagem e de um estoque de reprodutor. O sêmen foi criopreservado utilizando uma solução crioprotetora contento: HBSS, gema de ovo e dimetilsulfóxido (DMSO), sendo posteriormente avaliados parâmetros morfológicos, morfométricos, concentração espermática e cinética espermática por CASA. Indivíduos de origem selvagem apresentaram maior frequência de espermatozoides com cauda curta (19,94 ± 4,07%), enquanto os animais de um estoque de reprodutor apresentaram maior frequência de cauda fortemente enrolada (23,71 ± 9,28%) e macrocefalia (0,86 ± 0,54%). A motilidade (MOT) dos espermatozoides foi significativamente superior nas amostras de animais de estoque de reprodutores (71,76 ± 11,81%) em comparação às de origem selvagem (37,34 ± 17,61%). Além disso, os animais de um estoque de reprodutor apresentaram maior progressividade (PROG = 2.782 ± 498,1 µm), enquanto os indivíduos selvagens apresentaram maiores velocidades em linha reta (VSL = 110,7 ± 6,41 µm/s) e retilinearidade (STR = 88,51 ± 5,76%). Em conjunto, os resultados indicam que o protocolo de criopreservação foi eficaz na preservação de parâmetros relevantes da qualidade seminal em ambas as origens. No entanto, diferenças biológicas e de manejo podem influenciar a resposta espermática ao congelamento, reforçando integração de gametas provenientes dessas diferentes origens representa uma estratégia promissora para programas de reprodução assistida, combinando variabilidade genética selvagem com disponibilidade controlada de reprodutores.

Palavras-chave: criopreservação espermática; conservação *ex situ*; qualidade seminal; reprodutores selvagens e de aquacultura.

1. Introdução

A miraguaia, *Pogonias courbina* (Lacepède, 1803), pertence à família Sciaenidae e são peixes demersais e estuarinos. As populações de *P. courbina* estão distribuídas ao longo do Rio de Janeiro (Brasil) até o Golfo de San Matías (Argentina), sendo encontradas predominantemente na América do Sul (Azpelicueta *et al.,* 2019). No Estuário da Lagoa dos Patos, localizado no Rio Grande do Sul (Brasil), as *P. courbina* adultas formam grandes agregações ao longo da estação reprodutiva (Santos *et al.,* 2016). Durante esse período de maior vulnerabilidade, a espécie é explorada desde meados do século XIX, e desde o início da década de 1980 o desembarque pesqueiro diminuiu

drasticamente (Odebrecht, 2003; IBAMA/CEPERG, 2011; CTMFM, 2019; MAGyP, 2019).

Atualmente o estoque natural brasileiro de *P. courbina* é considerado colapsado, com uma recuperação ocorrendo a um ritmo muito lento (Chao *et al.,* 2015; Haimovici e Cardoso, 2017). Esta espécie foi incluída na Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção do Ministério do Meio Ambiente como “Em Perigo”, resultando na proibição da sua captura no Brasil (MMA, 2014). Em 2019, a espécie também foi avaliada para a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN e classificada como “Vulnerável” (Haimovici *et al.,* 2020). Recentemente, a espécie foi incluída na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção na categoria “Criticamente em Perigo” (MMA, 2026). Apesar da implementação de medidas restritivas à pesca, a recuperação populacional da *P. courbina* tem sido lenta, sobretudo devido à elevada vulnerabilidade da espécie durante o período reprodutivo (Haimovici e Cardoso, 2017).

A relevância comercial da espécie tem gerado pesquisas sobre essa espécie, existindo por exemplo, estudos que caracterizam os parâmetros reprodutivos das fêmeas (Macchi *et al.,* 2002), a idade para o início da maturidade reprodutiva (Santos e Velasco, 2021), a conectividade genética entre populações (Machado *et al.,* 2020), as características seminais de animais criados em cativeiro (Benato *et al.,* 2023) e a padronização do protocolo de criopreservação seminal (Benato *et al*., 2026). Estudos recentes têm investigado a viabilização da produção da espécie, como Andrade *et al*. (2025) sobre larvicultura e de Kuroski *et al.* (2025), que avaliou o efeito da temperatura sobre o crescimento de juvenis de *P. courbina*. Entretanto, ainda são escassas as informações sobre a influência da origem dos reprodutores na qualidade seminal após o processo de criopreservação, particularmente em comparações entre indivíduos provenientes de ambiente selvagem e de um estoque de reprodutor.

O uso do sêmen descongelado na aquicultura otimiza o manejo em incubatórios, preserva os estoques naturais e mantém os genótipos selvagens, essenciais para a recuperação genética futura e a biodiversidade das espécies (Suquet *et al.,* 2000; Vandeputte, 2011), reduz os custos e riscos com o

transporte de animais e previne a disseminação de doenças (Carneiro *et al*., 2012). A técnica também aumenta a eficiência dos programas de melhoramento genético (Maria *et al*., 2009; Viveiros *et al*., 2009; Carneiro *et al*., 2012). Constituindo uma ferramenta estratégica para a formação de bancos de germoplasma em espécies de interesse aquícola e conservacionista.

Alguns fatores biológicos como espécie, condição fisiológica, nutricional e ambiente de origem dos reprodutores, podem influenciar na qualidade espermática das amostras que serão congeladas, resultando em respostas diferentes entre indivíduos provenientes de um estoque de reprodutor e de ambientes selvagens (Cabrita *et al*., 2010; Cabrita *et al*., 2014). Nesse sentido, a avaliação de parâmetros espermáticos, incluindo cinética, morfologia e morfometria, torna-se essencial para compreender a eficiência da criopreservação (Magnotti *et al.,* 2023) e por consequência garantir a conservação do recurso genético alvo.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de um protocolo de criopreservação espermática para *P. courbina* em indivíduos oriundos de ambiente selvagem e de um estoque de reprodutor. A partir dessa comparação, buscou verificar se a origem dos reprodutores influencia a resposta do processo de criopreservação, gerando subsídios para o desenvolvimento de estratégias de manejo reprodutivo aplicáveis tanta a populações de origem um estoque de reprodutor quanto selvagens, além de contribuir para a formação de bancos de germoplasma da espécie.

2. Material e métodos

A coleta de amostras foi realizada na Estação Marítima de um estoque de reprodutor da Universidade Federal de Rio Grande (EMA/FURG) localizado em Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Embora a pesca de *P. courbina* esteja proibida no Brasil, a captura de indivíduos para fins científicos foi autorizada no âmbito desde estudo. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de

Animais da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA - FURG) (projeto 23116.006908/2017-81).

2.1 Manutenção dos reprodutores

Foram utilizados machos de miraguaia provenientes de duas origens: gerados no laboratório de produção de juvenis (F1) (n = 7; 2,1 ± 0,5 Kg; 53,5 ± 3,3 cm) e capturados na natureza (selvagem) (n = 4; 1,9 ± 0,1 Kg; 55,2 ± 3,6 cm).

Os animais F1 com 4 anos de idade, tiveram sua origem a partir de reprodutores capturados na natureza (F0). Desde a eclosão das larvas no laboratório, foram alimentados com dieta à base de peixe e lula frescas. Quando realizado o experimento, os animais estavam mantidos em tanques de 16.000 litros, com sistema recirculação aquícola (RAS) de água marinha, sob condições controladas (temperatura= 26,5 ± 0,6 ºC, pH = 7,7 ± 0,1, oxigênio dissolvido = 5,3 ± 0,6 mg/L, salinidade = 36 ± 1,4 g/L).

Os animais de origem selvagem, foram capturados previamente ao experimento e transportados até o laboratório da Estação Marítima de Aquacultura (EMA/FURG). Após a captura, os indivíduos foram mantidos em sistema RAS (com as características físico-química da água já descritas). Como foram animais capturados na natureza, não foi possível estimar a idade dos indivíduos. Ambas as origens receberam alimentação baseada em comida natural (peixe e lula).

2.2 Coleta de sêmen

O método de coleta foi padronizado para todos os grupos, onde os animais foram primeiro anestesiados em um banho de eugenol (50 mg/L) até atingirem um estágio de anestesia profunda (Vidal *et al*., 2007). Os peixes foram posicionados com a cabeça para cima, e uma pressão abdominal suave foi aplicada para facilitar a liberação do sêmen. A coleta foi realizada utilizando uma seringa estéril de 3 mL, imobilizando os animais com toalhas úmidas cobrindo os olhos para minimizar o estresse (Benato *et al*., 2023). O primeiro volume de sêmen foi descartado, evitando possível contaminação com fezes, sangue ou urina (Wayman *et al*., 1997).

Para evitar ativação precoce, as amostras selecionadas foram imediatamente diluídas na proporção de 1:3 (uma parte de sêmen para duas partes de diluidor) em solução diluidora HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution) com pH ajustado para 7,5 e osmolaidade de 281 mOsm/kg, conforme protocolo adaptado de Wayman *et al.* (1997).

2.3 Delineamento experimental

Avaliou-se a qualidade do sêmen criopreservado de *P. courbina* oriundos de um estoque de reprodutor (n = 7) e de ambientes selvagens (n = 4) (Figura 1). Para ambos os grupos (estoque de reprodutor e selvagem), as amostras foram analisadas em duplicata quanto à sua, morfologia, morfometria e concentração espermática. Os parâmetros cinéticos foram avaliados usando o sistema computadorizado CASA. Este delineamento experimental possibilitou a comparação entre os grupos, permitindo investigar potenciais diferenças na qualidade seminal em função da origem dos animais.

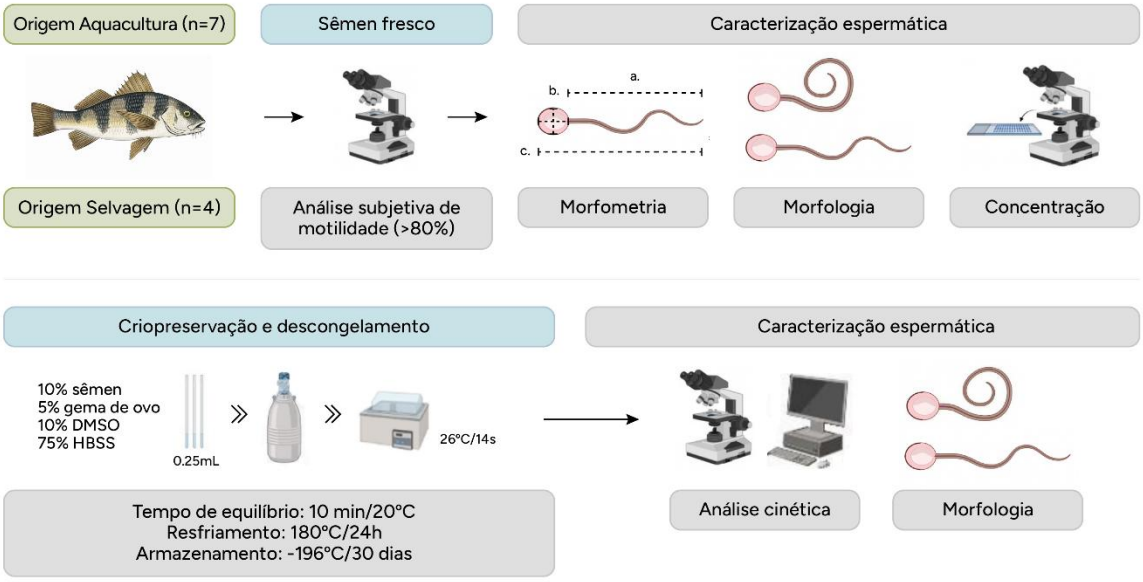


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental adotado para a comparação da qualidade do sêmen criopreservado de *Pogonias courbina*, provenientes de um estoque de reprodutor (n = 7) e ambiente selvagem (n = 4). As etapas envolveram coleta de sêmen, criopreservação, descongelamento e análises laboratoriais. Foram avaliados os parâmetros: morfologia espermática, morfometria espermática, concentração espermática e análise cinética computadorizada (CASA).

2.4 Caracterização espermática do sêmen fresco

2.4.1 Análise subjetiva

Imediatamente após a coleta, o sêmen previamente coletado foi diluído e ativado com água marinha (24º, pH 7,7), na proporção de 1:3 (Benato *et al*., 2026). Cada amostra de sêmen foi avaliada subjetivamente sob um microscópio óptico a 400× de ampliação, para verificar possível ativação prévia dos espermatozoides por contaminantes (água, fezes, urina ou sangue), utilizando uma taxa de motilidade de 0-100%. Amostras que apresentaram espermatozoides já ativados quando analisadas foram descartadas. Da mesma forma, apenas amostras com motilidade subjetiva superior a 80% foram consideradas aptas para os procedimentos de criopreservação (Benato *et al*., 2026). As amostras consideradas aptas foram fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10% em diluição 1:1000 (1 µL espermatozoides: 999 µL solução de formaldeído) para posterior análise da morfologia, morfometria e concentração espermática (Benato *et al*., 2023).

2.4.2 Morfologia espermática

A análise da morfologia espermática foi realizada usando corante rosa bengala, conforme Streit Jr *et al.* (2004). Antes da coloração, o sêmen foi previamente fixado em formaldeído (1:300). Para os indivíduos de origem selvagem, foram utilizados 9 µL da amostra previamente fixada, aos quais foram adicionados 36 µL de formaldeído e 5 µL da solução de rosa bengala. Para os indivíduos provenientes de um estoque de reprodutor, foram utilizados 5 µL da amostra previamente fixada, aos quais foram adicionadas 40 µL de formaldeído e 5 µL da solução de rosa bengala. As diferentes proporções de amostra foram adotadas devido às diferenças na concentração espermática observadas entre os indivíduos de origem selvagem e de um estoque de reprodutor.

A classificação das anormalidades morfológicas foi obtida subjetivamente, de acordo com Miliorini *et al*. (2011) com adaptações de Costa *et al*. (2022). As anormalidades foram classificadas nas seguintes alterações morfológicas: cabeça isolada/solta, cabeça degenerada, macrocefalia, microcefalia, cauda quebrada, cauda enrolada, cauda fortemente enrolada, cauda curta, cauda dobrada, gota citoplasmática proximal e distal. A análise foi realizada por microscopia de luz transmitida (Nikon Eclipse E200; Nikon, Tóquio, Japão), com

aumento de 400×, avaliando-se 100 espermatozoides por macho, em duplicata (Benato *et al*., 2023).

2.4.3 Morfometria dos espermatozoides

Para a morfometria dos espermatozoides, lâminas foram preparadas a partir da metodologia aplicada na avaliação da *Morfologia espermática* (Streit Jr *et al*., 2004). Após secagem à temperatura ambiente (25 °C), as lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E200; Nikon, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera (Basler AC640–120uc, 120 fps, Ahrensburg, Alemanha).

Os espermatozoides foram fotografados com aumento 400×, e uma lâmina micrométrica foi registrada nas mesmas condições ópticas para calibração das medidas. Para cada macho 50 espermatozoides, sem anormalidades, foram analisados e mensurando o comprimento e largura da cabeça e comprimento da cauda utilizando o software ImageJ (versão 1.54, NIH, USA).

2.4.4 Concentração espermática

Uma alíquota (10 µL) de espermatozoides, previamente diluídos em solução salina tamponada a 10%, foi pipetada em cada campo de contagem de uma câmara hematimétrica de Neubauer (Olen, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) (Benato *et al*., 2023), que foi coberta por uma lamínula e deixada por 15 min para que as células se estabilizassem (Streit Jr *et al*., 2004). Usando um microscópio com ampliação de 400x (Nikon E200, Tóquio, Japão) e um contador manual, os espermatozoides foram quantificados contando-se 10 quadrículas da câmara de Nebauer. Após a contagem de células, a concentração de espermatozoides foi aferida usando a equação descrita por Sanches *et al.* (2011).

2.5 Criopreservação

O sêmen coletado e diluído (1:3) em solução Hanks (HBSS) (adaptado de Wayman *et al.* (1997), foi considerado a solução "stock" do sêmen. O protocolo de criopreservação usado foi o de Benato *et al*. (2026), composto com 5% de

gema de ovo de galinha, 10% de DMSO e 75% de diluidor HBSS (pH 7,50 e osmolaridade 281 mOsm/L).

Imediatamente após a homogeneização, a solução foi envasada em palhetas de 250 µL, permanecendo por 10 minutos em tempo de equilíbrio na temperatura de 20 ºC. Após o equilíbrio, as palhetas foram transferidas e congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (dry-shipper), permaneceram por 24h antes de serem transferidas para botijão com nitrogênio líquido para o armazenamento. Após 30 dias do congelamento, as amostras foram descongeladas em banho maria (26 ºC por 14s), para as análises espermáticas de validação experimental.

2.6 Caracterização espermática do sêmen criopreservado

2.6.1 Morfologia espermática

O protocolo de morfologia espermática para o sêmen criopreservado seguiu os mesmos métodos utilizado para análise morfológica do sêmen fresco (2.4.2).

2.6.2 Parâmetros Cinéticos

As análises dos parâmetros cinéticos espermáticos foram realizadas por meio de um sistema de análise computadorizada de sêmen (CASA – *Computer Assisted Sperm Analysis*). O sêmen previamente coletado foi diluído e ativado com água marinha (24º, pH 7.7). Imediatamente após a ativação, 5 µL da solução foram depositados em câmara de hemocitômetro Neubauer, coberta com lamínula. A câmara foi posicionada sob microscópio de luz transmitida (Nikon Eclipse E200), acoplado a uma câmera de alta velocidade (Basler AC640-120uc; 120 fps; Ahrensburg, Alemanha), com aumento de 100x. Sincronicamente à ativação, iniciou-se a gravação de vídeos para registrar a movimentação dos espermatozoides, utilizando o software Pylon Viewer 4 (versão 4.1.0.3660, 64 bits; Basler, Ahrensburg, Alemanha), a uma taxa de captura de 100 quadros por segundo e resolução de 800 x 600 pixels. Os vídeos tiveram duração de 20 segundos, sendo a análise realizada em um intervalo de 0,5 segundos (50 frames), correspondente a 10 segundos após a ativação. Posteriormente, os

vídeos editados no software VirtualDub e analisados no software ImageJ, por meio do plugin CASA.

Os parâmetros utilizados na análise CASA foram: a = 5, b = 50, c = = 50, d = 8, e = 3, f = 6, g = 9, h = 5, i = l, j = 25, k = 10, l = 15, m = 80, n = 80, o = 50, p = 60, q = 100, r = 431,03, s = 0 e t = 0 (adaptado de Benato *et al*., 2023). Nessa configuração, foram considerados móveis os espermatozoides com VCL > 15 μm s^{-1} e VAP > 10 μm s^{-1}. Foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade espermática (MOT, %), velocidade curvilínea (VCL, μm s^{-1}), velocidade média de deslocamento (VAP, μm s^{-1}), velocidade em linha reta (VSL, μm s^{-1}), retilinearidade (STR, %) oscilação (WOB, %), progressividade (PROG, μm) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz).

2.7 Estatística

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão. A normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variâncias (Bartlett) dos dados foram verificadas. Quando necessário os dados foram transformados usando *arcseno da raiz quadrada de x*, e se a violação dos pressupostos seguia, outliers foram identificados usando ROUT (Q = 1%) e excluídos. Os dados normais e homogêneos foram analisados usando o Teste de T não pareado. Por outro lado, os resultados de gota citoplasmática distal, gota citoplasmática proximal, microcefalia, macrocefalia e largura da cabeça foram analisados usando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%. As análises e os gráficos foram realizados usando os programas computacionais R (RStudio versão 2025.09.02) e GraphPad Prism (Versão 10.2.0).

3. Resultados

3.1 Sêmen fresco

3.1.1 Morfologia espermática

A análise morfológica dos espermatozoides do sêmen fresco revelou que não houve diferença quanto origem dos reprodutores, um estoque de reprodutor (80,57 ± 9,04%) e selvagem (82,56 ± 1,56 %), para os espermatozoides considerados normais. Porém, nos animais com origem do estoque de

reprodutor a frequência de espermatozoides foi maior com cauda quebrada (3,46 ± 2,59%, p = 0,03) (Fig. 2).

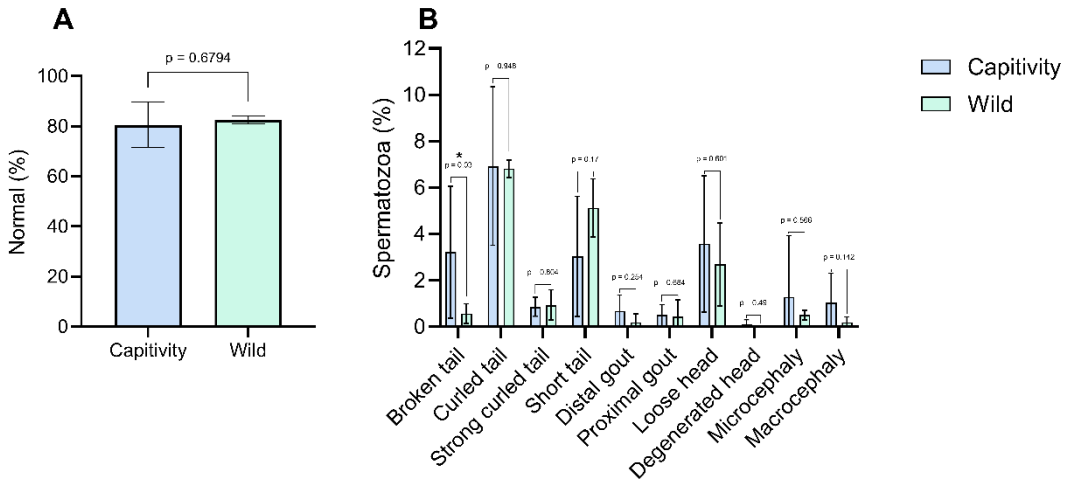


Figura 2. Parâmetros de morfologia espermática de sêmen fresco de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4). Para as categorias normal, cauda quebrada, enrolada, fortemente enrolada e curta, cabeça solta e degenerada foi utilizado o teste t não pareado. Para gota citoplasmática proximal e distal, microcefalia e macrocefalia foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os testes foram realizados à um nível de significância de 5%. As barras indicam a média ± desvio padrão quartis e os asteriscos as diferenças estatísticas (p < 0,05).

3.1.2 Morfometria dos espermatozoides

Em nenhuma das variáveis morfométricas analisadas (A = Largura da cabeça; B = Comprimento da cabeça; C = comprimento do flagelo) houve diferença entre espermatozoides dos peixes com origem em um estoque de reprodutor (A = 3.37 ± 0.2 µm; B = 3.39 ± 0.25 µm; C = 29.7 ± 1.48 µm) e selvagem (A = 2.96 ± 0.46 µm; B = 3.12 ± 0.34 µm; C = 26.48 ± 6.23 µm) (Fig. 3A, B, C).

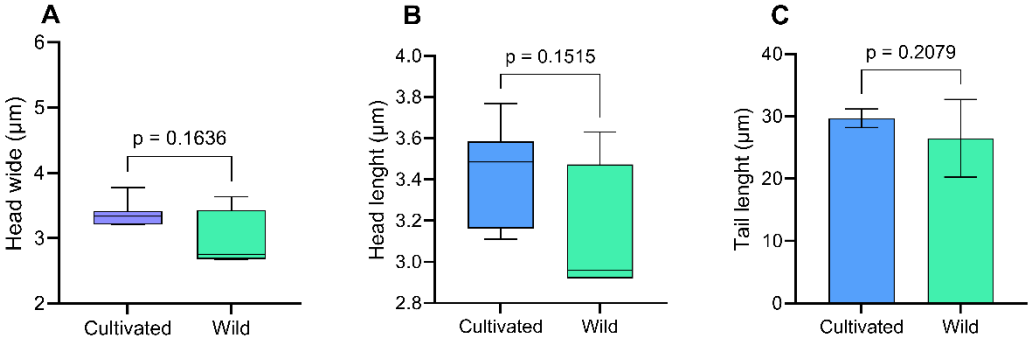


Figura 3. Largura da cabeça (A), comprimento da cabeça (B) e comprimento da cauda (C) dos espermatozoides de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e de origem selvagem (verde - n = 4). A largura e o comprimento da cabeça foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, enquanto o comprimento da cauda foi analisado pelo teste t não pareado, ambos a um nível de 5% de significância. Nas figuras A e B, as linhas representam a mediana e os quartis, na figura C as barras representam média ± desvio padrão.

3.1.3 Concentração espermática

Ambos as origens, um estoque de reprodutor (6,85 ± 1 $\times 10^8$ espermatozoides/$mL^{-1)}$ e selvagem (7,65 ± 0,88 $\times 10^8$ espermatozoides/mL^{-1}), apresentaram concentrações espermáticas semelhantes (p = 0,2; Figura 4).

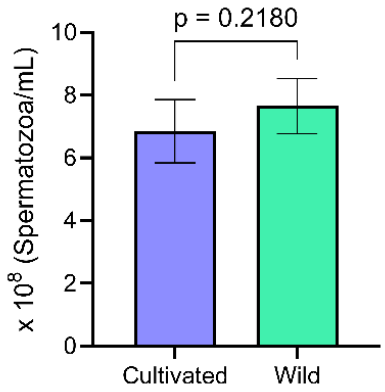


Figura 4. Parâmetros de concentração espermática do sêmen fresco de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4). As médias foram comparadas utilizando o teste t não pareado, com nível de significância de 5%. As barras indicam a média ± desvio padrão.

3.2 Pós descongelamento

3.2.1 Morfologia espermática

A análise morfológica dos espermatozoides pós descongelamento revelou que, os espermatozoides normais e as anormalidades associadas à cauda, como quebrada, enrolada, bem como gota citoplasmática distal e proximal, cabeça solta e degenerada e microcefalia, não diferiram entre os grupos (p > 0,05; Fig. 2). Por outro lado, nos animais com origem selvagem a frequência de espermatozoides foi maior com cauda curta (19,94 ± 4,07%, p = 0,03), enquanto os animais com origem na um estoque de reprodutor a maior frequência

observada foi nos espermatozoides com cauda fortemente enrolada (23,71 ± 9,28%, p = 0,01) e macrocefalia (0,86 ± 0,54%, p = 0,003) (Fig. 2).

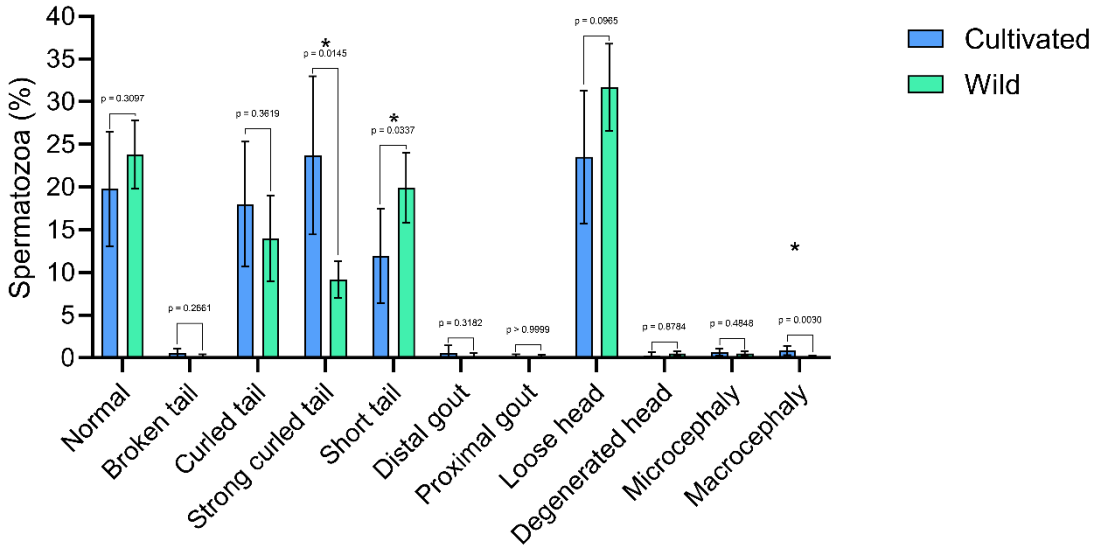


Figura 5. Parâmetros de morfologia espermática de sêmen criopreservado de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4). Para as categorias normal, cauda quebrada, enrolada, fortemente enrolada e curta, cabeça solta e degenerada foi utilizado o teste t não pareado. Para gota citoplasmática proximal e distal, microcefalia e macrocefalia foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os testes foram realizados à um nível de significância de 5%. As barras indicam a média ± desvio padrão quartis e os asteriscos as diferenças estatísticas (p < 0,05).

3.2.2 Cinética Espermática

Os dados referentes à motilidade e aos parâmetros cinéticos dos espermatozoides estão apresentados na Figura 6. A motilidade (MOT) dos espermatozoides foi significativamente superior nas amostras de sêmen dos animais provenientes de um estoque de reprodutor (72 ± 0.11%) em comparação as amostras dos animais de origem selvagem (37 ± 0.15%) (p = 0.003; Fig. 6A). Além disso, as amostras de sêmen dos animais provenientes do estoque de reprodutor apresentaram maior progressividade (PROG = 2782.18 ± 461.20 µm; p = 0.004; Fig. 6G) que as amostras dos machos com origem selvagem (PROG = 1797.28 ± 129.15 µm). Em contrapartida, nos animais de origem selvagem foi observado maiores velocidade em linha reta (VSL = 110.7 ± 5.55 µm/s vs. 84.29 ± 17.92 µm/s; p = 0,03; Fig. 6D) e retilinearidade (STR = 89 ± 0.09% vs. 68 ± 0.05%; p = 0,004; Fig. 6E) quando comparados aos animais provenientes do

estoque de reprodutores. Não foram observadas diferenças significativas para a para velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VAP), oscilação (WOB) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) entre as origens avaliadas (p > 0,05; Fig. 6B, C, F e H), cujo valores médios foram de 164.78 ± 11.92 e 156.36 ± 13.04 µm/s para VCL, 124.21 ± 16.58 e 125.64 ± 11.58 µm/s para VAP, 75 ± 0.06 e 80 ± 0.02% para WOB e 32.93 ± 5.34 e 30.29 ± 6.01 Hz para BCF, respectivamente, para os animais do estoque de reprodutores e de origem selvagem.

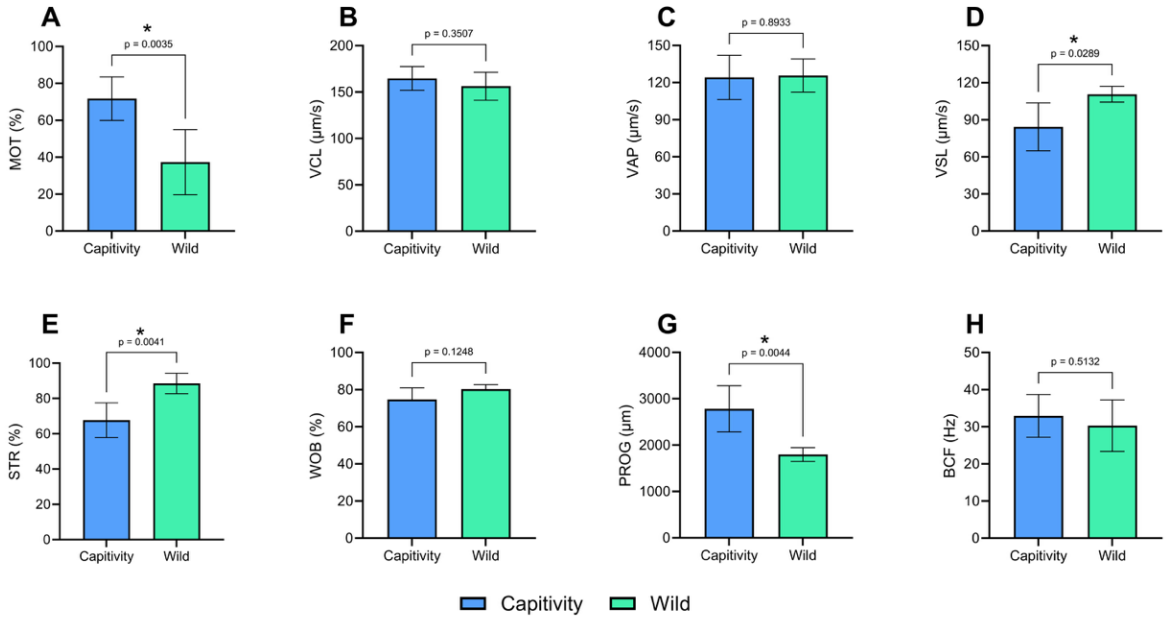


Figura 6. Parâmetros de motilidade e cinética espermática de sêmen criopreservado de machos de *Pogonias courbina* provenientes de um estoque de reprodutor (azul - n = 7) e ambiente selvagem (verde - n = 4). As análises foram realizadas com auxílio do sistema computadorizado CASA. Foram avaliados: (A) motilidade espermática (MOT%), (B) velocidade curvilínea (VCL, µm/s), (C) velocidade média do deslocamento (VAP, µm/s), (D) velocidade em linha reta (VSL, µm/s), (E) retilinearidade (STR, %), (F) oscilação (WOB, %), (G) progressão (PROG, µm) e (H) frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz). As barras indicam a média ± desvio padrão e os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos (p < 0,05; teste t não pareado).

4. Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram que o protocolo de criopreservação desenvolvido para a *P. courbina,* pode ser usado para preservar parâmetros funcionais relevantes do sêmen criopreservado, independente da origem dos estoques dos reprodutores (estoque de reprodutor ou selvagem).

Esses achados são de notável relevância diante do colapso do estoque brasileiro da espécie e da lenta recuperação populacional observada, mesmo após a proibição da pesca (Chao *et al*., 2015; Haimovici e Cardoso, 2017). Diante desse cenário, estratégias voltadas à conservação genética, como a criopreservação de gametas, tem indícios positivos para serem utilizadas como ferramentas fundamentais para subsidiar programas de manejo, recuperação populacional e cumprimento das diretrizes estabelecidas pela legislação ambiental e pesqueira brasileira (Lei n° 11.959/2009; PAN Marinho, 2011).

Sêmen fresco

A análise morfológica do sêmen fresco de *P. courbina* apresentou valores esperados de células normais para ambas as origens avaliadas. Esses resultados indicam boa qualidade espermática inicial, demonstrando que os reprodutores utilizados apresentavam condições adequadas para os procedimentos de criopreservação. Entretanto as anormalidades foram observadas, onde a ocorrência de cauda quebrada foi superior em indivíduos de origem de um estoque de reprodutor. As anormalidades morfológicas dos espermatozoides podem ter diferentes origens e mecanismos de formação. Em mamíferos, as anomalias primarias são originadas durante o processo da espermatogênese (Herman *et al*., 1994). Em peixes, a origem das anormalidades espermática permanece pouco compreendida, uma vez que são escassos os estudos que a classificam de acordo com sua origem. Dessa forma, alguns trabalhos adotam, por analogia, os critérios de classificação estabelecidos para mamíferos (Costa *et al*., 2024). Entretanto, é importante considerar que os mecanismos de ativação dos espermatozoides e fertilização dos oócitos ocorre externamente na grande maioria das espécies de peixes, criando particularidades que podem influenciar a interpretação dos diferentes critérios morfológicos e a origem de determinadas anormalidades espermáticas.

De modo geral a integridade estrutural dos espermatozoides resulta da interação entre diversos fatores intrínsecos (fisiológicas) ou extrínsecos (biológicos e ambientais) (Kumaresan *et al*., 2020). A cauda quebrada é uma anormalidade classificada como secundária para mamíferos (Chenoweth, 2005), ou seja, ocorre após a espermatogênese, logo relacionada com o processo

posterior a configuração estrutural do espermatozoide. Em algumas espécies animais, como aves, espermatozoides com cauda quebrada tem uma correlação negativa direta com a motilidade espermática (Feyisa *et al*., 2017). De todo modo, é importante frisar que o percentual de espermatozoides com cauda quebrada nos animais provenientes de um estoque de reprodutor é baixo, e provavelmente não afetou a motilidade média dos espermatozoides observada nestes animais.

As medidas morfométricas dos espermatozoides de *P. courbina* foram semelhantes aos valores previamente descritos para a espécie (Benato *et al*., 2023), indicando padrão estrutural relativamente conservado entre as origens avaliadas. A morfometria espermática permite relacionar forma e função celular, podendo refletir diferenças em longevidade e desempenho de motilidade (Snook, 2005; Miliorini, 2007). Já foi observado em *Salmo salar* que espermatozoides de maior tamanho apresentam menor tempo de motilidade, enquanto células menores tendem a permanecer móveis por períodos mais prolongados (Gage *et al.,* 2002). Nesse contexto, a caracterização da morfometria espermática em *P. courbina* fornece referência importante para a definição de padrões estruturais da espécie e para a detecção de alterações associadas à eficiência reprodutiva. Além disso, essa abordagem pode contribuir para a identificação de falhas reprodutivas em peixes considerados aptos à reprodução (Miliorini, 2007), tornando-se uma ferramenta complementar relevante na avaliação da qualidade seminal e no suporte a programas de reprodução assistida e conservação.

No presente estudo, a origem do estoque de reprodutores não comprometeu concentração espermática da *P. courbina,* sendo próximos aos valores observados por Benato *et al*., (2026) em *P. courbina*. Segundo Cabrita *et al*. (2009), a caracterização do sêmen pode subsidiar comparações futuras na avaliação da qualidade espermática, o que torna relevante as informações obtidas quanto a concentração espermática da *P. courbina*. Neste sentido, a concentração espermática é reconhecida como um indicador de qualidade seminal em peixes (Robles *et al*., 2003; Nynca *et al*., 2016). Além disso, a determinação da concentração espermática é fundamental para o estabelecer a dose inseminante adequada, ou seja, o número de espermatozoides necessários para fertilizar um oócito, como já definido para inúmeras espécies. Neste caso,

com a concentração espermática caracterizada, permite o melhor aproveitamento do volume seminal disponível, com consequente aumento do número de oócitos fertilizados e com isso eficiência dos programas de reprodução assistida (Kwantong, 2009; Salmito-Vanderley *et al*., 2023).

Sêmen criopreservado

Muito embora os espermatozoides de *P. courbina* tenham apresentado baixa proporção de células morfologicamente normais após a criopreservação, em indivíduos de um estoque de reprodutor e nos selvagens, o protocolo de criopreservação protegeu as células espermáticas de forma semelhante para ambos os grupos. A morfologia espermática é utilizada como um indicador de qualidade seminal em peixes, uma vez que alterações estruturais podem comprometer o processo de fertilização (Magnotti *et al*., 2023; Costa *et al*., 2024). O aumento da frequência de anormalidades após a criopreservação é esperado e tem sido relatado em diversas espécies de peixes (Streit *et al*., 2006; Streit *et al*., 2009; Costa *et al*., 2020), estando associado a variações extremas de temperaturas, desidratação celular (Mazur, 1984) e à formação de cristais de gelo, que comprometem a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (Ozkavukcu *et al*., 2008).

Em relação às anormalidades de cabeça observadas após a criopreservação, apenas a macrocefalia apresentou diferença significativa entre as origens avaliadas. A frequência dessa alteração foi baixa (<1%), o que pode representar um impacto biológico limitado, dessa anormalidade, sobre a qualidade seminal. As anormalidades morfológicas de cauda foram predominantes em animais de ambas as origens, com maior ocorrência de cauda curta nos animais selvagens e cauda fortemente enrolada nos animais de um estoque de reprodutor, podendo essas alterações estarem associadas a variações ambientais, nutricionais e de manejo reprodutivo. Tais alterações estruturais na cauda podem comprometer a motilidade espermática, ao afetar o padrão de oscilação e deslocamento celular dos espermatozoides (Benato *et al*., 2023).

Anormalidades relacionadas à cauda são frequentemente relatadas após o processo de criopreservação em diferentes espécies de peixes (Streit Jr *et al*., 2009; Costa *et al*., 2024), estando relacionadas aos estresses físicos e osmóticos decorrentes ao congelamento e descongelamento celular. Embora a fertilização não tenha sido avaliada neste estudo, as anormalidades observadas em animais de origem de um estoque de reprodutor e selvagem sugerem alterações estruturais compatíveis com os padrões descritos na literatura para células espermáticas morfologicamente alteradas. Apesar das diferenças observadas, ambas as origens apresentaram padrões morfológicos semelhantes após a criopreservação, o que indica uma possível resposta estrutural comparável ao protocolo

A análise cinética evidenciou diferenças funcionais entre as amostras de sêmen de peixes de diferentes origens após a criopreservação. Os resultados de MOT e PROG superiores observados dos espermatozoides *de P. courbina* criopreservados de origem do estoque de reprodutor, possivelmente está associada a adaptação ao manejo em cativeiro (Lehnert *et al*., 2012), como idade (Ciereszko *et al*., 2020) e histórico nutricional controlado (Cabrita *et al*., 2014). Diferenças cinéticas dessa natureza podem estar parcialmente associadas à qualidade morfológica dos espermatozoides, uma vez que alterações estruturais influenciam a hidrodinâmica celular, consequentemente a trajetória e a velocidade de natação (Costa *et al*., 2022). Neste caso, a cauda fortemente enrolada observada nos animais com origem no estoque de reprodutor, pode estar relacionado com o fato de menor velocidade observado no VSL e STR.

Animais criados em cativeiro podem apresentar características espermáticas, como morfologia e cinética, distintas de animais selvagens (Butts *et al*., 2010). A variabilidade observada em parâmetros cinéticos é amplamente descrita em peixes e reflete a sensibilidade desses indicadores tanto à origem dos reprodutores quanto às condições de criopreservação (Benato *et al*., 2023). Além disso, diferenças na velocidade espermática podem estar associadas ao estágio de maturação reprodutiva e à qualidade estrutural das células, fatores previamente associados ao potencial de fertilização em espécies de teleósteos (Gage *et al*., 2002; Gallego *et al*., 2013).

Diferenças observadas em morfologia e cinética espermática indicam que fatores biológicos e de manejo podem modular a reposta celular ao congelamento. Em conjunto, esses resultados indicam que indivíduos com origem no estoque de reprodutor e selvagem podem contribuir de maneira complementar e estratégica para programas de reprodução assistida, ao combinar variabilidade genética natural com disponibilidade controlada de reprodutores. Os parâmetros de qualidade do sêmen avaliados neste estudo são amplamente utilizados em pesquisas de reprodução de peixes (Ciereszko *et al*., 2020; Cabrita *et al*., 2022) e apresentam alta correlação com o sucesso reprodutivo de diversas espécies (França *et al*., 2024), indicando que o protocolo de criopreservação utilizado é eficaz para a preservação do sêmen tanto para reprodutores provenientes de um estoque de reprodutor quanto de populações selvagens. Assim, os resultados obtidos reforçam o papel da criopreservação como ferramenta complementar em estratégias de manejo e formação de bancos de germoplasma, contribuindo para a preservação da diversidade genética e para ações de conservação de *P. courbina* em cenários de declínio populacional.

5. Conclusão

É possível criopreservar sêmen de *P. courbina*. Ambas as origens, selvagem e estoque de reprodutor, mantêm os parâmetros estruturais e funcionais relevantes da qualidade seminal quando in natura. No pós descongelamento, a motilidade espermática é considerada viável, e evidencia a eficácia do protocolo utilizado para diferentes origens de reprodutores. Entretanto mudanças no protocolo devem ser estudadas devido a perda de espermatozoides morfologicamente normais durante o processo de criopreservação.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agraço ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do edital 133063/2025-9.

Referência

[1] Andrade, L.; Menossi, O.; Samapaio, L.; Muelbert, J. 2025. Description of eggs, larvae, and early juveniles of Southern black frum (Pogonias courbina) reared in captivity. National Marine Fisheries Service - NOAA, 251-260, 123(4). DOI: 10.7755/FB.123.4.4

[2] Azpelicueta MdlM, Delpiani SM, Cione AL, Oliveira C, Marceniuk AP, Dı´az de Astarloa JM (2019) Morphology and molecular evidence support the validity of Pogonias courbina (Lacepède, 1803) (Teleostei: Sciaenidae), with a redescription and neotype designation. PLoS ONE 14(6): e0216280. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0216280.

[3] Benato JL, Streit Jr D, Teixeira NDS, Rodrigues RB, de Freitas TR, Okamoto M, Rodrigues R, dos Santos RS, Dantas RV, Balbinot APdA, de Oliveira RRB, Maltez LC, Menossi O, Sampaio LA. (2023). Pogonias courbina sperm characteristcs in its first reproductive season. PeerJ 11:e15600 https://doi.org/10.7717/peerj.15600.

[4] Benato JL, Teixeira NDS, Rodrigues RB, Lozano KT, Dantas RV, Nicoleti ET, Valdivia-Gutiérrez G, Alencar LQ, Barros WMS, Okamoto MH, Rodrigues RV, Sampaio LA, Streit DP. (2026). A stepwise methodology for developing fish sperm cryopreservation protocols: application to the endangered Pogonias courbina, Cryobiology, V. 123, https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2026.105604.

[5] Brasil. Política Nacional de Pesca e Aquicultura (Lei N° 11.959/2009). Diário Oficial da União :https ://www.plano.gov .br/cc/_ato200-201/200/lei /eu.htm

[6] Butts IA, Litvak MK, Trippel EA. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, Gadus morhua. Theriogenology. 2010 Apr 15;73(7):873-85. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.011. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20047755

[7] Cabrita E, Horv´ath ´ A, Marinovi´ c Z, Asturiano JF. Technologies and strategies for ex situ conservation of aquatic organisms: the role of cryopreservation in long-term management. In: Fernand´ ez I, Fernandes J, editors. Cellular and molecular approaches in fish biology. London: Academic Press; 2022. p. 1–48. https://doi. org/10.1016/B978-0-12-822273-7.00011-2.

[8] Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., Herráez, M.P., Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. Aquaculture 432, 389–401..

[9] Cabrita, E., Robles, V., Herrárez, P. Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species. Boca Raton: CRC Press, 2009.

[10] Cabrita, E.; Sarasquete, C.; Martínez-Paramo, S.; Robles, V.; Beirão, J.; Pérez-Cerezales, S.; Herráez, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology 26: 623–635. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x.

[11] Carneiro, P.; Azevedo, H.;Santos, J.; Maria, A. 2012. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoptectants, dilution ratios and freezing. CryoLetters 33 (5), 385-393 =.

[12] Chao NL, Frédou FL, Haimovici M, Peres MB, Polidoro B, Raseira MO, Subirá R, Carpenter K (2015) A popular and potentially sustainable fishery resource under pressure[1]extinction risk and conservation of Brazilian Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). Glob Ecol Conserv 4:117–126. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.06.002

[13] Chenoweth PJ. Genetic sperm defects. Theriogenology. 2005 Aug;64(3):457-68. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.005.

[14] Ciereszko A, Judycka S, Nynca J, Słowi´nska M, Dietrich MA. Factors influencing milt quality in fishes and its usefulness to cryopreservation. In: Betsy J, Kumar S, editors. Cryopreservation of fish gametes. Singapore: Springer; 2020. p. 25–67. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_3.

[15] Costa BB, Oliveira DL, Rodrigues RB, Gomes IC, Streit DP Jr. Morphological abnormalities in zebrafish cryopreserved sperm. Cryobiology 2020; 97 : 235-237. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.003

[16] Costa BB, Lassen PG, Streit DP Jr. Cryopreservation-Induced Morphological Changes in Freshwater Fish Sperm: A Systematic Review. Biopreserv Biobank. 2024 Oct;22(5):416-427. doi: 10.1089/bio.2023.0008. Epub 2024 Jan 24. PMID: 38265831.

[17] CTMFM (Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo) (2019). http://ctmfm.org/archivos-de-captura/.

[18] Feyisa SG, Park YH, Kim YM, Lee BR, Jung KM, Choi SB, Cho CY, Han JY. Morphological defects of sperm and their association with motility, fertility, and hatchability in four Korean native chicken breeds. Asian-Australas J Anim Sci. 2018 Aug;31(8):1160-1168. doi: 10.5713/ajas.17.0626.

[19] França TS, González-Lopes WA, Sanches MP, Ferrão L, Fernández-Garcia F, Borges LP, Belenguer A, Holhorea PG, Calduch-Giner JC, Felip A, Gómez A, Pérez-Sánchez J, Streit Jr. DP, Asturiano JF (2024). Successful cryopreservation in biodegradable containers of sperm from aquaculture Mediterranean fishes. Volume 216, P. 53-61. Theriogenology. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.016.

[20] Gallego, V., Carneiro, P.C.F., Mazzeo, I., Vílchez, M.C., Peñaranda, D.S., Soler, C., Pérez, L., Asturiano, J.F., 2013. Standardization of European eel (Anguilla anguilla) sperm motility evaluation by CASA software. Theriogenology 79, 1034–1040.

[21] Gage M, Macfarlane C, Yeates S, Shackleton R, Parker GA. 2002. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 61:1528-1539

[22] Haimovici M, Cardoso LG (2017) Long-term changes in the fisheries in the Patos lagoon estuary and adjacent coastal waters in southern Brazil. Mar Bio Res 13(1):135–150. https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1228978.

[23] Haimovici, M., Chao, L., Vieira, J.P., Buratti, C., Díaz de Astarloa, J., Irigoyen, A., Riestra, C., Landaeta, M. & Hüne, M. 2020. Pogonias courbina. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T159145751A159145756. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020- 2.RLTS.T159145751A159145756.en

[24] Herman, H. A. 1994. The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Diary and Beef Cattle. Illinois: Interstate Publishers.

[25] IBAMA/CEPRG (2011) Desembarque de pescados no Rio Grande do Sul 2009. Rio Grande, Brazil.

[26] Kumaresan A, Das Gupta M, Datta TK, Morrell JM. Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. Front Vet Sci. 2020 Jun 19;7:321. doi: 10.3389/fvets.2020.00321.

[27] Kuroski, Lucas C. Maltez, Olivia Menossi, Thiago P.A.P. Oliveira, Brandon J.Q. Gamboa, Marcelo H. Okamoto, Ricardo V. Rodrigues, Luis A. Sampaio, (2025). Influence of temperature on growth and oxidative status of juvenile Southern black drum (Pogonias courbina), Aquaculture Reports, Volume 40, 102560, ISSN 2352-5134, https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102560.

[28] Kwantong S, Bart AN. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, Pangasius hypophthalmus (Sauvage), Aquaculture Research

[Internet]. 2009 [cited 2022 Dez 01]; 40(3):292-297. Disponível em: https://onlinelibrary. wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2008.02088.x.

[29] Lehnert, S. J., D. D. Heath, and T. E. Pitcher 2012. Sperm trait differences between wild and farmed Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Aquaculture 242–249:242–247

[30] Macchi GJ, Acha EM, Lasta CA (2002) Reproduction of black drum (Pogonias cromis) in the Rio de la Plata estuary, Argentina. Fish Res 59:83–92. https://doi.org/10.1016 /S0165-7836(01)00410-6.

[31] Machado, R.C., da Silva Cortinhas, M.C., Proietti, M.C. et al. Genetic connectivity of black drum (Pogonias courbina) stocks in the southwestern Atlantic Ocean. Environ Biol Fish 103, 913–926 (2020). https://doi.org/10.1007/s10641-020-00993-6.

[32] Magnotti C, Mattos DC, Owatari MS, Castilho-Barros L, Sterzelecki FC, Mendonça RC, 2023. Métodos e aplicações da conservação de sêmen em peixes marinhos. Ciências agrárias: a multidisciplinaridade dos recursos naturais. Cap. 5, p. 91. DOI 10.37423/221206936

[33] MAGyP, Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca (2019) http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/pesca_ maritima/desembarques/.

[34] Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology-Cell Physiology 247: C125–C142.

[35] MMA - Ministério do Meio Ambiente (2014) Portaria n° 445, de 17 de Dezembro de 2014. Diário Oficial da União. Brasília, 18 de dezembro de 2014, N° 245, Seção 1. http://www.icmbio.gov. br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2014/p_ mma_445_2014_lista_peixes_amea%C3%A7ados_extin%C3 %A7%C3%A3o.pdf.

[36] Murgas, L. D. S.; Miliorini, A. B.; Freitas, R. T. F.; Pereira, G. J. M. 2007. Cryopreservation of curimba (Prochilodus lineatus) semen after addition of different diluters, activators and cryoprotectants. Revista Brasileira de Zootecnia 36 (3): 526–531 DOI: 10.1590/S1516-35982007000300002.

[37] Nieland DL, Wilson CA. Reproductive biology and annual variation of reproductive variables of black drum in the Northern Gulf of Mexico. Trans Amer Fish Soc. 1993. 122; 318–327.

[38] Nynca J, Dietrich GJ, Liszewska E, Judycka S, Karol H, Do bosz S, Krom J, Ciereszko, A. Usefulness of a portable flow cy tometer for sperm concentration and viability measurements of rainbow trout spermatozoa. Aquaculture. 2016; 451:353-356. (https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848615301873).

[39] Odebrecht C (2003) A Lagoa dos Patos no século XIX na visão do naturalista Hermann Von Ihering. Editora Ecoscientia, Rio Grande.

[40] Ozkavukcu S, E. Erdemli, A. Isik, D. Oztuna, S. Karahuseyinoglu, Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa, J. Assist. Reprod. Genet. 25 (2008) 403–411, https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3.

[41] Plan De Ação Nacional (Pan) Para Conservação Dos Ecossistemas Marinhos (Pan Marinho). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 2011.

[42] Robles, V., Cabrita, E., Cunado, S., Herraez, M.P., 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): parameters that affect its ability for freezing. Aquaculture 224, 203–212.

[43] Sanches EA, Marcos RM, Baggio DM, Tessaro L, Balen RE, Bombardelli RA. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito (2011). R Bras Zootec. 2011 Jun; 40(6):1163–7. Available from: https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001

[44] Santos PR, Einhardt CMC, Velasco G (2016) A pesca artesanal da miragaia (Pogonias cromis, Sciaenidae) no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil. Bol Inst Pesca, São Paulo 42:89–101. https://doi.org/10.20950/1678.2305.2016v42n1p89.

[45] Santos PRS, Velasco G, (2021) Reduction of reproductive parameters of Pogonias courbina (Perciformes, Sciaenidae) in southern Brazil. Regional Studies in Marine Science, v41. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101590.

[46] Salmito-vanderley, c. S. B.; vieira, m. . J. Da a. F.; torres, t. M.; apoliano, m. L. Da s.; melo, c. H. S. De; salgueiro, c. C. De m.; nunes, J. F. Determinação da concentração espermática de tambaqui (Colossoma macropomum) por espectrofotometria. Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science, Goiânia, v. 24, 2023. DOI: 10.1590/1809-6891v24e-74695E.

[47] Snook R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends In Ecology & Evolution* 20:46-53

[48] Streit DPJr., Benites C, Moraes GV de, et al. Semen of pacu (Piaractus mesopotamicus) criopreserved used diluent for swine semen (in Portuguese). Cienc Anim Bras 2006;7(3): 289–297.

[49] Streit Jr, D. P., De Oliveira, A. C., Ribeiro, R. P., Sirol, R. N., De Moraes, G. V., Galo, J. M., & Digmayer, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de Piaractus mesopotamicus. Boletim do Instituto de Pesca, 35(2), 159-167, 2009.

[50] Streit Jr, D. P.; De Moraes, G. V.; Ribeiro, R. P.; Povh, J. A.; De Souza, E. D.; De Oliveira, C. A. L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR 7:157–162. DOI: 10.25110/arqvet. v7i2.2004.82.

[51] Suquet, M.; Dreanno, C.; Fauvel, C.; Cosson, J.;Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research. 31(3): 231-243. DOI: 10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x.

[52] Vidal, L. V. O.; Furuya, W. M.; Graciano, T. S.; Schamber, C. R.; Silva, L. C. R.; Santos, L. D.; Souza, S. R. 2007. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (Brycon cephalus). Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 8, 335-342.

[53] Wayman, W. R.; Thomas, R. G.; Tiersch, T. R. 1997. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. Theriogenology, 47(8), 1519-1529. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00158-1

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que o sêmen criopreservado de *Pogonias courbina*, tanto de origem selvagem quanto de um estoque de reprodutor, mantêm os parâmetros estruturais e funcionais importantes da qualidade seminal nos indivíduos de origem selvagem. A integração de gametas provenientes dessas diferentes origens configura uma estratégia promissora para programas de reprodução assistida, ao aliar variabilidade genética dos estoques naturais à disponibilidade controlada de reprodutores em cativeiro. Nesse contexto, a criopreservação espermática destaca-se como uma ferramenta relevante para conservação *ex situ,* ampliando as perspectivas de recuperação dessa espécie colapsada e contribuindo para a manutenção da diversidade genética de populações naturais em declínio.

ANEXO 1- REPRODUCTIVE BIOLOGY – GUIDE FOR AUTHORS

Article structure

This section describes the article structure for this journal.

Sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of the published literature.

Essential title page information

Title: Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.Recommended for full title to set at max. 20 words and 6 words for the short title.

Author names and affiliations: Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author: Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

Present/permanent address: If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Acknowledgements: Collate acknowledgements in a separate section and include them on the title page only. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Abstracts

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the

author(s) and year(s). Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract should not be divided into sections, aims, methods etc. (not structured). Abstracts for Original Articles should not exceed 250 words

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Use the abbreviations sparingly: only those abbreviations that are firmly established in the field are eligible. The keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations that are unavoidable must be defined twice: (1) at their first mention in the Abstract and (2) at their first mention in the remaining part of the article. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

This section describes the artwork for this journal.

Electronic

artwork General points

Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

Embed the used fonts if the application provides that option.

Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

Number the illustrations according to their sequence in the text.

Use a logical naming convention for your artwork files.

Provide captions to illustrations separately.

Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.

Submit each illustration as a separate file.

Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is f inalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Please note:

Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

This section describes the references for this journal

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2010;163:51-9. https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. Heliyon. 2018;19:e00205. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927-34) (see also Samples of Formatted References).

Reference style

Format the references in compliance with the recommended style for this journal:

Last name, initial, full paper title, journal full name, year, volume (number) first and last page.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Paivio A, Jansen B, Becker LJ. Comparisons through the mind's eye. Cognition 1975;37(2):635–47.

[2] Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor α, estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. J Steroid Biochem Mol Biol 2003;84(2–3):279–289.

Reference to a book:

[3] Letheridge S, Cannon CR, editors. Bilingual education: teaching English as a second language. New York: Praeger; 1980.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 3rd ed. New York: MacMillan; 1979 [chapter 4].

Reference to a conference (only abstracts 2-page long may serve as references):

[5] Douglis F, Ball Th. Tracking and viewing changes on the web. In: Proc. 1996 USENIX technical conference; 1996.

Reference to a Dataset

[6] [dataset] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

After acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author inquiries

Author Inquiries

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

ANEXO 2 – CERTIFICADO CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL
Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CEUA

AUTORIZAÇÃO DE ALTERAÇÃO DE VIGÊNCIA Nº 002/2020

PROCESSO Nº	23116.006908/2017-81
CEUA Nº	Pq021/2017
UNIDADE	Instituto de Oceanografia
TÍTULO DO PROJETO	Reprodução, larvicultura e produção de juvenis de miragaia *Pogonias cromis*
NÚMERO DE ANIMAIS	60 Adultos e 67.000 Larvas
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Julho de 2022
PROFESSOR RESPONSÁVEL	Luís André Nassr de Sampaio

PARECER DA CEUA:

Após a análise de sua solicitação de alteração de vigência, enviada a essa comissão em 09 de novembro de 2020, a CEUA-FURG considera **APROVADA** a data de 30 de junho de 2022 como término da vigência do projeto.

Rio Grande, 30 de novembro de 2020.

Med. Vet. Alice T. Meirelles Leite
Coordenadora da CEUA-FURG

Controle da CEUA - Parecer(es) prévio(s) relacionado(s) ao processo: P051/2017; P071/2017; Autorização de Alteração de Protocolo Experimental 002/2019; Autorização de Alteração de Protocolo Experimental 004/2020. Página 1/1

VITA

Leonardo Queiroz de Alencar filho de Valda Queiroz de Alencar e Carlos Leôncio Silva de Alencar, é natural de Manaus no estado do Amazonas-AM, nascido em 27 de abril de 1998.

Concluiu o ensino médio no Centro Educacional Adalberto Valle-CEAV, AM, e a graduação de bacharel em Zootecnia em 2024 na Universidade Federal do Amazonas.

Iniciou a Pós graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 2024, na área de Produção Animal, sendo bolsista CNPq. Nesse período realizou atividades de pesquisa e ensino no Grupo de Pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas), com foco principal no desenvolvimento e aprimoramentos de técnicas voltadas as metodologias de reprodução, avaliação de qualidade e criopreservação de gametas de peixes.