

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

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE
PEIXES: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE.**

PAULA GRAZIELA LASSEN
Zootecnista – UFSM
Mestre em Zootecnia - UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção do
grau de Doutor em Zootecnia

Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre – RS – Brasil
Maio de 2020

PAULA GRAZIELA LASSEN

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE
PEIXES: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE.**

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

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Lassen, Paula Graziela
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS
DE PEIXES: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE. / Paula
Graziela Lassen. -- 2020.
137 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Criopreservação. 2. Qualidade espermática. 3.
Peixes neotropicais. 4. Revisão sistemática. 5.
Meta-análise. I. Streit Jr., Danilo Pedro, orient.
II. Título.

Paula Graziele Lassen
Mestre em Zootecnia

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTORA EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

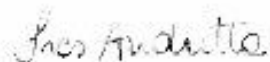
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 28.05.2020
Pela Banca Examinadora

Homologada em: 22/04/2020
Por

DANILO PEDRO STREET JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

DANILO PEDRO STREET JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



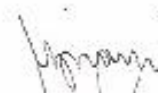
Tania Andretta
CFRGS



Eduardo Antônio Sanchez
UNESP



Jayme Aparecido Foyt
UFMS



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

Agradecimentos

Agradeço a todos que tornaram esse trabalho possível. Em primeiro lugar, a minha instituição de ensino, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Aos meus colegas que integram o grupo de pesquisa Aquam (Produção e Conservação das Espécies Aquáticas) que conviveram comigo por esse período. Aos professores pela orientação durante toda minha trajetória acadêmica, em especial aos convidados para participar da banca. Ao meu orientador pela paciência, incentivo, amizade, pelos conhecimentos passados e por ter me acompanhado durante últimos anos da minha formação acadêmica e profissional, me oferecendo inúmeras oportunidades de aprendizado. A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro durante o período do doutorado. Por último e não menos importante, à minha família e amigos, especialmente aos meus pais e minha irmã, Hervé, Rosa e Priscila, meus maiores apoiadores e motivadores.

Muito obrigada.

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMEN DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE PEIXES: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE.

Autor: Paula Graziela Lassen

Resumo - Uma revisão sistemática e meta-análise (MA) foram realizadas para resumir as evidências científicas dos efeitos da criopreservação do esperma de espécies neotropicais sul americanas de peixes de água doce nos indicadores de qualidade espermática caracterizados pela motilidade e anormalidades morfológicas. A estratégia de busca foi aplicada em quatro bases de dados eletrônicas, os principais critérios de inclusão envolveram estudos realizados com peixes neotropicais cujos gametas masculinos foram submetidos ao processo de criopreservação. Meta-análise para efeitos aleatórios foi realizada para cada indicador separadamente com a média dos grupos controle e grupos tratados. Um total de vinte e cinco publicações relatando 26 estudos e 131 ensaios foram incluídos na MA envolvendo 44 peixes de espécies distintas. Foi observada heterogeneidade entre os estudos em todas as variáveis. De maneira geral, o sêmen criopreservado apresentou motilidade significativamente inferior ao sêmen fresco. A motilidade aumenta ($P < 0,01$) com maior proporção de diluição do sêmen. A percentagem de células normais não apresentou alterações significativas após a criopreservação. As anormalidades morfológicas primária aumentaram, significativamente, a um nível de 1,91% (IC 95%: - 3,72, - 0,09; $P = 0,02$), após a criopreservação, quando comparadas ao sêmen fresco. A percentagem de anormalidades secundárias não mostrou alteração significativa ($P \geq 0,05$) entre sêmen fresco e criopreservado. Nossos resultados sugerem que a criopreservação com o uso de crioprotetores álcoois e amidas parecem favorecer taxas de motilidade e aumenta significativamente ($P < 0,05$) a percentagem de anormalidades primárias pós criopreservação, não causando influência significativa na alteração de anormalidades secundárias do sêmen criopreservado de espécies neotropicais sul-americanas de água doce.

Palavras-chave: criopreservação, sêmen, peixes neotropicais, qualidade espermática.

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (150p.) Maio, 2020.

CRYOPRESERVATION OF SEMEN OF NEOTROPICAL FISH SPECIES: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Author: Paula Graziela Lassen

Abstract - A systematic review and meta-analysis (MA) was carried out to summarize the scientific evidence of the effects of cryopreservation of sperm from neotropical species of South American freshwater fish on sperm quality indicators characterized by motility rate and morphological abnormalities. The search strategy was applied to four electronic databases and the main inclusion criteria involved studies with neotropical fish whose male gametes were submitted to the cryopreservation process. Meta-analysis for random effects was performed for each indicator separately with the average of the control and treated groups. A total of twenty-five publications reporting 26 studies and 131 trials were included in the MA involving 44 fish of different species. Heterogeneity was observed among studies in all variables. In general, cryopreserved semen showed significantly lower motility than fresh semen. Motility increases ($P < 0,01$) with a higher proportion of semen dilution. The percentage of normal cells did not change significantly after cryopreservation. Primary morphological abnormalities increased significantly, at a level of 1,91% (95% CI: - 3,72, - 0.09; $P = 0,02$), after cryopreservation, when compared to fresh semen. The percentage of secondary abnormalities did not show a significant change ($P \geq 0,05$) between fresh and cryopreserved semen. Our results suggest that cryopreservation with the use of cryoprotectants alcohols and amides seems to improve motility rates and significantly ($P < 0,05$) increases the percentage of primary abnormalities after cryopreservation, causing no significant influence in the alteration of secondary abnormalities of the cryopreserved semen of neotropical South American freshwater species.

Keywords: cryopreservation, semen, neotropical fish, sperm quality.

¹ Doctoral thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (150p.) May, 2020.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. ESPÉCIES NEOTROPICAIS	17
2.2. FISIOLOGIA DO SÊMEN.....	17
2.3. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	19
2.3.1. Motilidade espermática e tempo de motilidade	20
2.3.2. Anormalidades espermáticas.....	21
2.4. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES.....	25
2.4.1. Soluções Diluidoras	27
2.4.2. Crioprotetores	27
2.4.2.1. Crioprotetores permeáveis.....	28
2.4.2.2. Crioprotetores não permeáveis.....	30
2.5. CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS SUL-AMERICANAS.....	31
2.6. REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE	32
3. HIPÓTESES DO TRABALHO	34
4. OBJETIVOS	34
4.4. OBJETIVO GERAL	34
4.5. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	34
CAPÍTULO II ¹	35
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
PESQUISA E FONTE DE DADOS	39
MÉTODOS DE BUSCA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ESTUDOS.....	39
SELEÇÃO DOS ESTUDOS	40
EXTRAÇÃO E MANIPULAÇÃO DE DADOS	41
AVALIAÇÃO DO RISCO DE VIÉS.....	42
META-ANÁLISE	43
Análise de subgrupos.....	43
VIÉS DE PUBLICAÇÃO	43
META-REGRESSÃO	44
META-ANÁLISE CUMULATIVA E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE	44
RESULTADOS.....	44
IDENTIFICAÇÃO DE ESTUDOS E EXTRAÇÃO DE DADOS	44
RISCO DE VIÉS	45
ANÁLISE DE SUBGRUPOS.....	45
VIÉS DE PUBLICAÇÃO.....	47
ANÁLISE DE META-REGRESSÃO	47

META-ANÁLISE CUMULATIVA E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE	48
DISCUSSÃO	48
EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE	49
AGRADECIMENTOS	53
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO III ¹	74
1 INTRODUÇÃO	76
2 MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1. PESQUISA E FONTE DE DADOS.....	77
2.2. SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	79
2.3. EXTRAÇÃO E MANIPULAÇÃO DE DADOS.....	80
2.4. AVALIAÇÃO DO RISCO DE VIÉS	81
2.5. META-ANÁLISE	81
2.6. VIÉS DE PUBLICAÇÃO.	82
2.7. META-REGRESSÃO	82
2.8. META-ANÁLISE CUMULATIVA E ESTUDOS INFLUENTES	82
3 RESULTADOS	83
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE ESTUDOS E EXTRAÇÃO DE DADOS.....	83
3.2. RISCO DE VIÉS	84
3.3. META-ANÁLISE	87
3.3.1. Efeito da criopreservação na percentagem de anormalidades	87
3.4. VIÉS DE PUBLICAÇÃO	87
3.5. ANÁLISE DE META-REGRESSÃO	89
3.6. META-ANÁLISE CUMULATIVA E ESTUDOS INFLUENTES	89
4 DISCUSSÃO	89
5 CONCLUSÃO	93
CAPÍTULO IV.....	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE	116
ANEXOS.....	118
VITA.....	135

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação e nomenclatura dos defeitos dos espermatozoides em mamíferos..... 22

Tabela 2. Classificação e nomenclatura dos defeitos dos espermatozoides de peixes..... 24

CAPÍTULO II

Tabela 1. Sequências de termos de pesquisa de população, resultado e intervenção usados para a pesquisa final na revisão sistemática..... 61

Tabela 2. Um resumo descritivo de cada estudo relevante incluído na meta-análise e meta-regressão sobre motilidade de sêmen criopreservado de peixes..... 62

Tabela 3. Características descritivas das publicações de relatórios dos estudos incluídos na revisão sistemática-meta-análise..... 64

Tabela 4. Validade interna dos estudos incluídos na revisão sistemática usando a ferramenta Cochrane Collaboration para avaliar o risco de viés para motilidade de sêmen criopreservado de peixes..... 65

Tabela 5. Resumo da avaliação metodológica e / ou notificação das publicações que relatam os estudos incluindo nesta revisão..... 67

Tabela 6. Análises de subgrupo realizadas na meta-análise do indicador motilidade de sêmen criopreservado de peixes..... 68

Tabela 7. Resultados da meta-regressão univariada mostrando covariáveis significativas ($P < 0,05$) investigadas como potenciais fontes de heterogeneidade do estudo. Os resultados explicados para cada uma das covariáveis incluídas na meta-análise são apresentados para percentagem de motilidade de sêmen criopreservado de peixes..... 70

CAPÍTULO III

Tabela 1. Sequências de termos de pesquisa de população, resultado e intervenção usados para a pesquisa final na revisão sistemática..... 78

Tabela 2. Um resumo descritivo de cada estudo relevante incluído na meta-análise sobre anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos..... 82

Tabela 3. Características descritivas das publicações de relatórios dos estudos incluídos na revisão sistemática-meta-análise sobre anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos..... 83

Tabela 4. Resumo da avaliação metodológica e / ou notificação das publicações que relatam os estudos incluindo nesta revisão..... 84

Tabela 5. Validade interna dos estudos incluídos na revisão sistemática de anormalidades morfológicas no sêmen criopreservado de espécies de peixes neotropicais sul americanas usando a ferramenta Cochrane Collaboration para avaliar o risco de viés..... 85

Tabela 6. Análises estratificadas realizadas na meta-análise do indicador anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos..... 87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Fluxograma descrevendo o processo de triagem para a revisão dos efeitos da criopreservação nos indicadores de qualidade do sêmen de peixes neotropicais de água doce. MA: meta-análise. Adaptado das diretrizes do PRISMA (Moher et al. 2009) 71

Figura 2. Gráfico de funil obtido com o “trim and fill” de Duval e Tweedie, modelo de efeito aleatório linear de preenchimento medindo a diferença média na motilidade como resposta. Os círculos representam a estimativa pontual original para cada estudo (DM) e as círculos envolvidos em um quadrado representam os estudos que o programa imputou (n = 34) para criar um gráfico simétrico..... 72

CAPÍTULO III

Figura 1. Fluxograma descrevendo o processo de triagem para a revisão dos efeitos da criopreservação no indicador de anormalidade dos espermatozoides de peixes neotropicais sul-americanos de água doce. MA: meta-análise. Adaptado das diretrizes do PRISMA (Moher et al. 2009) 77

Lista de abreviaturas

ACP: Água de coco em pó	MIII®: Merck III
ALH: Amplitude deslocamento lateral da cabeça	MeOH: Metanol
ATP: Trifosfato de adenosina	Me ₂ SO: Dimetilsulfóxido
BCF: Frequência de batida cruzada	METH: Metilglicol
BTS®: Beltsville Thawing Solution	mg – miligrama
Ca ⁺² : Cálcio	mL – mililitro
CASA: Computer Assisted Sperm Analysis	mM – miliMolar
DMA: Dimetilacetamida	mOsm: miliosmol
DMF: Dimetilformamida	MR: Meta-regressão
DNA: Deoxyribonucleic Acid	OH: Radical Hidroxil
ED: Extração de dados	PPG: Propilenoglicol
ETG: Etilenoglicol	PRG: Espermatozoides móveis progressivos
EROS: Espécies reativas de oxigênio	RS: Revisão sistemática
g: Grama	s: Segundo
GLY: Glicerol	SDM: o desvio padrão da média
Hz: Hertz	VAP: Velocidade média de deslocamento
K ⁺ : Potássio	VCL: Velocidade curvilinear
Kg: Quilograma	VSL: Velocidade em linha reta
LIN: linearidade	WOB: Índice de oscilação
pH - potencial hidrogeniônico	%: Percentagem
MA: Meta-análise	°C: Graus centígrados
MF: Metilformamida	µm: Micrometro

Capítulo I

1. Introdução

A aquicultura mundial vem crescendo em números e expandindo fronteiras ano após ano, sendo o setor de produção de alimentos de origem animal o de maior crescimento. Segundo dados da FAO (2018), só na América Latina e Caribe a aquicultura deverá crescer 49,2% até 2030, atingindo 4,033 milhões de toneladas produzidas. Para a próxima década, esses dados estatísticos (FAO, 2018) apontam para o Brasil como sendo um dos países com maior aumento na produção (89%), ficando atrás apenas do Peru (120%).

Segundo Lenz (2014), a piscicultura vem despertando interesse por ser uma maneira econômica para produzir alimento nobre em curto espaço de tempo. O país apresenta potencial crescimento no setor por possuir vasta área de lâmina d'água, construção de reservatórios (Saint-Paul, 2017) e pelo desenvolvimento de políticas governamentais de incentivo aos usos múltiplos das águas, além de apresentar grande número de espécies com potenciais para cultivo (Lenz, 2014). Só no ano de 2019, a piscicultura brasileira apresentou um crescimento de 4,9% comparado ao ano anterior, fechando sua produção de peixes cultivados em 758.006 toneladas, e deste montante 38% é representada por peixes de espécies nativas brasileiras (PEIXEBR, 2020). O crescimento constante observado nos últimos anos ocorre devido forte investimento no setor, assim como pesquisas que são aplicadas no desenvolvimento, melhoria e consolidação da cadeia no país (Schulter et al., 2017).

Esse montante, de 38%, produzido oriundo do cultivo espécies nativas em tanques é composto na sua maioria peixes migradores, que necessitam de estímulos do ambiente para maturação gonadal e reprodução. Estas espécies não apresentam a capacidade de desovar em ambientes lênticos devido à falta de estímulos ambientais adequados para tal, como o exercício da migração em si, profundidade ou corredeiras (Mylonas et al., 2010). O conhecimento das táticas reprodutivas é fundamental para a compreensão das estratégias do ciclo da vida, bem como, para nortear medidas de administração, manejo e preservação frente a impactos, como exaustão dos estoques naturais (Vazzoler & Menezes, 1992).

A criopreservação de sêmen de peixes é uma técnica de grande interesse para a piscicultura e que pode ser utilizada como rotina nos laboratórios de reprodução. São muitas as razões que justificam o uso dessa técnica, dentre elas Maria et al.

(2009) destacam a conservação de recursos genéticos, que vem sendo afetado pelas intervenções humanas no ambientais por consequência do declínio nos estoques de peixes, colocando em risco a variabilidade genética das espécies, e gerando assim o interesse na criação de bancos de germoplasma. Segundo os dados do ICMBio/MMA (2018), existem 312 espécies de peixes continentais ameaçadas de extinção, sendo 101 espécies criticamente em perigo, 112 em perigo e 99 em estado de vulnerabilidade.

De acordo com Ninhaus-Silveira et al. (2002), para o desenvolvimento da piscicultura há a necessidade de melhorar o processo reprodutivo em cultivo. Neste sentido, a formação de bancos de germoplasma de peixes possibilita eliminar a assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, reduz os gastos com a manutenção de muitos reprodutores facilitando o processo de melhoramento genético das espécies e, conseqüentemente, aumentando a produção das pisciculturas.

Quando criopreservada, a estrutura e funcionalidade de células e tecidos vivos são mantidas, conservando-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (Pegg, 2007). O desafio para o sucesso dessa técnica está na retirada do excesso de água presente no interior da célula espermática, evitando assim a formação de cristais de gelo que podem causar danos funcionais irreversíveis (Mazur, 1984). Um dos primeiros relatos na literatura sobre o congelamento de sêmen de peixes no mundo foi realizado na década de 1950 por Blaxter (1953). O Brasil iniciou suas pesquisas cerca de 30 anos depois e hoje possui mais de 22 espécies de peixes que já foram estudadas para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen, bem como outros tecidos e células, com especial destaque para os diferentes gêneros que compõem a família dos Characidae (Carosfeld et al., 2003; Maria et al., 2006; Viveiros et al., 2011; Varela Jr et al., 2015) e Pimelodidae (Araújo, 2011, Pardo-Carrasco et al., 2015; Da Costa et al., 2019). O desenvolvimento de protocolos depende da padronização de métodos mais adequados de coleta e diluição, determinação de diluidores e crioprotetores mais eficazes, tipos de recipientes para armazenamento do sêmen e velocidades de resfriamento, congelamento e descongelamento específicas, além da eficiência do processo, mensurada pela taxa de fertilização e eclosão.

Pesquisas vêm sendo realizadas a respeito da criopreservação de sêmen de peixes sul-americanos (Godinho et al., 2003; Maria et al., 2006; Murgas et al., 2007; Streit Jr, et al., 2009; Galo et al., 2011; Viveiros et al., 2012; Varela Junior et al., 2012; Vasconcelos et al., 2015; Garcia et al., 2015; Galo et al., 2019; Da Costa et al., 2019), porém os resultados obtidos ainda estão sujeitos a variações. Para permitir que a criopreservação de sêmen de peixes se torne uma prática eficiente e rotineira em larga escala dentro do setor produtivo, há necessidade de maior aporte de informações e avanços tecnológicos. Com isso, objetivamos através do uso de uma revisão sistemática e meta-análise realizarmos um estudo sobre o impacto da criopreservação nos parâmetros de qualidade do sêmen de espécies neotropicais sul-americanas de peixes.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Espécies neotropicais

A ictiofauna neotropical dulcícola é uma das mais ricas e diversificadas do mundo. De acordo com o estudo de Reis et al. (2016), existem cerca de 5.160 espécies de peixes de água doce na América do Sul, distribuídas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens. As duas ordens mais representativas em número de espécies conhecidas nesta região são os Characiformes e os Siluriformes. Dentre elas, temos espécies que são consideradas ideais para cultivo, onde as principais são as da família Characidae.

Para o sucesso da produção dessas espécies em ambientes de cultivo, é necessário conhecimento e controle sobre a reprodução, buscando assim programar a liberação de gametas, obtendo um fornecimento constante de animais para os sistemas de cultivo, e conseqüentemente, para o mercado (Bromage, 1995). Em ambiente natural, a reprodução dessas espécies pode apresentar variação nas datas e tipo de ambiente, mas na sua maioria ocorre de novembro a janeiro, ou seja, sua migração coincide com o início do período chuvoso quando os peixes se movem pelo rio, para lagos e rios menores adjacentes. Essa migração permite que os animais se exponham a estímulos ambientais como aumento da temperatura, fotoperíodo e precipitação pluviométrica que são essenciais no desenvolvimento da gametogênese, e conseqüentemente responsáveis pela determinação do período de maturação gonadal e desova dos peixes (Badisseroto et al, 2014).

2.2. Fisiologia do sêmen

O sêmen de peixe é composto pelo plasma seminal e espermatozoides. Geralmente, os espermatozoides de peixes são imóveis dentro dos testículos e sua mobilidade inicia-se quando expostos ao ambiente aquático (Coward et al., 2002). Características presentes no plasma seminal como osmolalidade, composição iônica, potencial hidrogênioônico (pH) e presença de proteínas, garantem o estado de imobilidade das células no ducto espermático (Alavi e Cosson, 2006). A ativação do espermatozoide ocorre quando fatores químicos são alterados. Os mecanismos envolvidos na ativação da motilidade espermática são considerados de vital importância na regulação de processos como fertilização artificial e criopreservação

(Figuroa et al., 2015). Em peixe teleósteos, um dos tipos de ativação da motilidade espermática é desencadeada por uma cascata de alterações iônicas (K^+ e Ca^{+2}) (Dzyuba & Cosson 2014). De modo geral, o pH do sêmen de peixes de água doce varia de 6,5 a 8,5, sendo que os valores acima ou abaixo desse intervalo geralmente contribuem para a redução do movimento flagelar (Tabares et al., 2005). O decréscimo no pH intracelular dos espermatozoides inibe a atividade da ATPase (responsável pela hidrólise do ATP), interferindo na motilidade espermática (Browne et al., 2015). A motilidade é acionada pelo decréscimo da concentração de K^+ no meio extracelular, causando um efluxo desse íon através de canais específicos da membrana, levando a sua hiperpolarização e iniciação da motilidade (Alavi e Cosson, 2006). Assim como o influxo de Ca^{+2} , através de canais de cálcio é responsável pela sinalização da atividade motora da ATPase, que hidrolisa o ATP, fornecendo energia para o início da motilidade do flagelo com alta velocidade (Figuroa et al. 2014). O tempo de motilidade dura de poucos segundos a menos de 2 minutos, sendo finalizado quando os estoques energéticos intracelulares se tornam limitantes ao movimento espermático causa aumento da sua concentração intracelular sinalizando o acionamento da motilidade espermática (Browne et al., 2015).

A osmolalidade tem sido identificada como o principal fator para o gatilho da motilidade espermática, independente da temperatura, pH ou a composição iônica do meio externo (Cabrita et al., 2009). Essas alterações ocorrem quando os espermatozoides entram em contato com o meio externo, após sua liberação durante o processo de reprodução (Cosson 2012). A osmolaridade do plasma seminal dos peixes de água doce apresenta em média 300mOsm/L, sendo que a ativação do movimento ocorre em condições hiposmóticas (Browne et al., 2015). Estudos avaliando a osmolaridade do sêmen de espécies nativas de água doce sul-americanas encontraram os valores médios de 247 mOsm/L em *Colossoma macropomum* (Farias et al., 1999), 313 mOsm/L em *Piaractus brachypomus* (Nascimento et al., 2010), 350 mOsm/L em *Brycon insignis* (Viveiros et al., 2011), e 300 mOsm/L para *Brycon orbignyanus* (Nascimento et al., 2012), 281 mOsm/L em *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al., 2016).

A capacidade do espermatozoide alcançar e fecundar o oócito deve ser considerada como um dos principais parâmetros na avaliação da qualidade do sêmen (Rurangwa et al., 2004; Bobe e Labbé, 2010). Assim, é indicado o uso de soluções

osmóticas balanceadas com substratos que possam favorecer o início e manutenção da motilidade nos espermatozoides (Adames et al., 2015).

Viveiros et al. (2012) testou em *Brycon nattereri*, soluções de NaCl a 0,29% (80 mOsm) e NaHCO₃ a 1% (220 mOsm), e obteve taxas de motilidade iguais para as duas soluções, com duração maior utilizando NaHCO₃ a 1%. Diferentes concentrações de NaCl (0,3%; 0,6%; 0,9%) e água destilada foram avaliadas para *P. lineatus*, apresentando taxas de motilidade e duração maiores para água destilada e NaCl a 0,3% (Felizardo et al., 2011). Soluções de NaCl e de NaHCO₃, tem apresentado bons resultados em outras espécies nativas, como o *C. macropomum* (Carneiro et al.; 2012), e *Salminus brasilienses* (Carolsfeld et al., 2003; Zanandrea et al., 2014), com variações entre as espécies.

2.3. Avaliação espermática

A qualidade do espermatozoide é fundamental para o processo de reprodução refletindo diretamente o sucesso da fertilização, e os parâmetros para motilidade e morfologia espermática são frequentemente usados como indicadores da qualidade espermática (Galo et al., 2011; Sanches et al., 2013; Figueroa et al., 2016;). No Brasil, a motilidade espermática, o tempo de duração da motilidade, e a taxa de fertilização têm sido os principais parâmetros avaliados para determinar a eficiência de protocolos de coleta (Orfão et al., 2010; Sanches e Cerqueira, 2011).

A motilidade é essencial para a fertilização e geralmente manifesta uma correlação positiva com a capacidade de fertilização (Sanches et al., 2013; Figueroa et al., 2016). A motilidade espermática dos peixes é induzida devido ao contato com a água; osmolaridade e conteúdo iônico do ambiente aquático são fatores centrais na ativação da motilidade (Figueroa et al., 2016). Inúmeros fatores, como efeitos biológicos (por exemplo, nutrição, idade, estágio de maturação gonadal, manejo) e efeitos decorrentes do manuseio da amostra (por exemplo, osmolaridade do meio de ativação, preparação da lâmina histológica ou método de coloração de espermatozoides), que segundo Miliorini et al. (2011) podem influenciar a motilidade e morfologia do esperma de peixe. Além disso, protocolos de conservação, envolvendo congelamento e uso de crioprotetores, podem resultar em danos celulares

causados pela formação de gelo intracelular, efeito da solução, toxicidade crioprotetora, estresse oxidativo, dentre outros fatores que afetam tanto a motilidade quanto a morfologia do esperma (Aramli et al., 2016).

2.3.1. Motilidade espermática e tempo de motilidade

O percentual de motilidade espermática é considerado o melhor biomarcador para a qualidade espermática em peixes (Boryshpolets et al. 2013). De fato, foram relatadas altas correlações entre a motilidade espermática e taxas de fertilização e eclosão em algumas espécies de peixes (Gallego et al. 2018).

Usualmente uma gota de sêmen é colocado em uma lâmina de vidro rigorosamente limpa e levado a microscópio de luz em aumento de 100, 200 ou 400X. Em seguida a solução ativadora é acrescentada e a motilidade avaliada e expressa em percentagem de espermatozoides móveis em relação ao total (Viveiros et al., 2014). A duração da motilidade ou tempo de motilidade, pode ser estimada por observação visual de movimento até cessação total da atividade. As chances de obter sucesso na fertilização artificial, no final do período de motilidade diminui devido à menor proporção de espermatozoides nadadores e à menor velocidade (Neumann et al., 2019). De acordo com Gallego e Asturiano (2019), a avaliação da motilidade espermática pode ser realizada de duas diferentes maneiras: a) análise subjetiva, pela qual um técnico experiente faz uma avaliação da motilidade espermática através de uma simples observação sob o microscópio; e b) análise objetiva pela qual software sofisticado integra as sucessivas posições das cabeças dos espermatozoides em movimento, em imagens consecutivas de registros de vídeo para calcular as trajetórias e suas características.

Gallego et al. (2018) relatam que o método de avaliação subjetiva foi o mais utilizado para avaliar a motilidade espermática por muito tempo, mas alguns problemas surgiram desse método. Os mesmos autores descrevem que a limitação do olho humano considerada uma desvantagem, pois só podemos fornecer uma avaliação grosseira da percentagem de motilidade espermática e sua duração. Além disso, este tipo de avaliação irá depender da experiência do observador e de vários aspectos, tais como densidade espermática, velocidade esperada, e desvios que

podem causar leituras superestimadas ou subestimadas. Por outro lado, Kime et al. (2001) sugerem que a adoção gradual do computador ajudou a implementar sistemas de análise de espermatozoides (Computer Assisted Spem Analysis - CASA), que tornaram possível estimar um número maior de parâmetros de movimento espermático, fornecendo a comunidade científica novas ferramentas úteis para serem aplicadas em estudos.

O CASA tornou possível estimar um número maior de parâmetros de movimento espermático, como a velocidade dos espermatozoides, modelos de padrões de movimento, subpopulações de esperma (Gallego et al, 2018), que não são dados por avaliação subjetiva, fornecendo novas ferramentas úteis para serem aplicadas em estudos. De acordo com Kowalski e Cejko (2019), em geral, a aplicação do sistema CASA fornece ao observador objetivos resultados e dados repetíveis, estimando um maior número de parâmetros cinéticos dos espermatozoides, incluindo velocidade média de deslocamento (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), espermatozoides móveis progressivos (PRG, %), linearidade (LIN, %), índice de oscilação (WOB, %), amplitude deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batida cruzada (BCF, Hz). Apesar da análise CASA ser objetiva e livre de erros humanos, deve-se levar em consideração que diferentes sistemas CASA podem produzir diferenças nos valores medidos devido a razões técnicas (Boryshpolets et al. 2013).

2.3.2. Anormalidades espermáticas

A morfologia espermática expressa o percentual de espermatozoides normais e anormais, e os anormais podem ser classificados em primários e secundários. A determinação destes defeitos tem servido de parâmetro para alertar sobre fatores que possam provocar alterações na fertilidade desde que foi discutida por Blom (1973) para bovinos, cuja classificação tem sido adotada ao longo dos anos, inclusive para peixes, mesmo que ainda seja questionável para esse espécime. Para Kavamoto et al. (1999), sua influência na infertilidade dos machos alcançou importância com o desenvolvimento da técnica de inseminação artificial, especialmente na espécie bovina. Galo et al. (2019) observou que a porcentagem de anormalidades primárias

nos espermatozoides de peixes é a principal variável que influencia as taxas de fertilização e eclosão no sêmen fresco ou descongelado de *Piaractus mesopotamicus*.

Em mamíferos, as anormalidades primárias se referem às enfermidades relacionadas a espermatogênese, enquanto as anormalidades espermáticas secundárias se relacionam aos problemas após a espermatogênese (Chenoweth, 2005). Observa-se na Tabela 1, a classificação das anormalidades em mamíferos e a característica observada.

Tabela 1 - Classificação e nomenclatura dos defeitos dos espermatozoides em mamíferos.

Classificação	Característica observada
Primária	
Acrossomo	Acrossomo rompido, enrugado ou dobrado, destacado e grânulo persistente do acrossomo.
Cabeça	Estruturas subdesenvolvidas, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, cabeça estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal, contorno anormal da cabeça e presença de vacúolos na cabeça.
Gota Proximal	Presença.
Peça intermediária	Fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogotas e outras que possam ser percebidas.
Cauda	Cauda fortemente dobrada e enrolada ou dobrada com gota citoplasmática distal.
Formas teratológicas	Espermatozoides aberrantes, contendo cabeça, cauda e/ou peça intermediária supranumerária.
Secundária	
Cabeça	Cabeça delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal.
Cauda	Cauda dobrada ou enrolada
Gota citoplasmática distal	Presença

Fonte: Adaptado de CBRA (2013) e Blom, (1973).

As avaliações das anormalidades morfológicas seminais dos peixes foram desenvolvidas com base nestas classificações pré-existentes utilizadas para mamíferos. No entanto, a fisiologia da produção espermática dos peixes possui particularidades inexistentes aos mamíferos, o que levanta a dúvida sobre quais são as principais anormalidades espermáticas que aparecem em cada espécie e se existe alguma correlação negativa das mesmas com a taxa de fertilização (Cabrita et al., 2009). Bem como se os efeitos dos protocolos de criopreservação seminal, crioprotetores e diluidores possuem ação distinta entre mamíferos e peixes, assim como dentre espécies de peixes.

Baseados nessa classificação clássica para mamíferos, inúmeros autores adotam esta classificação, primárias e secundárias, para anormalidades espermáticas em peixes, como: Streit Jr. et al., (2009) para *P. mesopotamicus*; Milliorini et al. (2011) para *P. lineatus*; Galo et al. (2011) para *B. orbignyana*. Uma classificação de anormalidades para *P. lineatus* foi proposta por Milliorini et al. (2011) (Tabela 2). Esta classificação passou a ser adaptada e utilizada nos anos seguintes, para avaliação de anormalidades em espécies como *C. macropomum* (Garcia et al., 2015), *P. lineatus* (Vasconcelos et al., 2015), *Rhamdia quelen* (Da Costa et al., 2019), no sêmen fresco e sobre efeito de tratamentos.

As avaliações de alterações morfológicas de sêmen após a criopreservados tem sido adotada em estudos com espécies sul-americanas. Um exemplo foi o trabalho de Streit Jr. et al. (2009), que usando sêmen de *P. mesopotamicus*, relataram um aumento na ocorrência de alterações morfológicas primárias após criopreservação, encontrando pré e pós criopreservação, respectivamente, uma percentagem de 46,73% e 54,60%. Indicativo de que essas anormalidades nos espermatozoides de peixe podem ser causadas pelo processo de criopreservação e não por espermatogênese, corroborado por outros estudos, com: *B. orbignyana* (Galo et al., 2011); *C. macropomum* (Garcia et al., 2015); *R. quelen* (Da Costa et al., 2019); *P. mesopotamicus* (Galo et al., 2019). Uma reclassificação para as patologias oriundas do processo de criopreservação deveria ser considerada a partir destas evidências, observadas nestes estudos relacionados.

Tabela 2 – Classificação e nomenclatura dos defeitos dos espermatozoides de peixes

Classificação	Característica observada
Primárias	
Macrocefalia	Espermatozoides que apresentam cabeça gigante, com contorno e formas anormais, sem aparente degeneração cromatínica ou vacuolar.
Microcefalia	Espermatozoides com tamanho de cabeça reduzido, com contorno e formas anormais, sem degeneração cromatínica ou vacuolar aparente.
Cabeça degenerada	Espermatozoides com cabeça de tamanho e formas normais, mas que apresentam contorno irregular e ou degeneração cromatínica ou vacuolar aparente.
Peça intermediária degenerada (PID)	Alterações em espessura (terço médio da peça intermediária), densidade, difração, e comprimento da peça, envolvendo seu contorno e sua inserção na cabeça.
Cauda quebrada	Células espermáticas com fratura ou retenção de cauda.
Cauda enrolada	Dobradura e enovelamento da cauda sobre si mesma ou sobre a cabeça. Foram considerados somente os enovelamentos que pudessem comprometer a motilidade espermática.
Cauda curta	Espermatozoides que apresentam descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária.
Secundárias	
Cabeça isolada normal	Cabeça observada sem cauda, porém sem qualquer alteração á cabeça.
Cauda dobrada	Dobradura da cauda em diversos graus, sem envolver a si mesmo ou a cabeça.

Fonte: Adaptado de Milliorini (2011).

2.4. Criopreservação de sêmen de peixes

A criopreservação é caracterizada como a preservação da viabilidade do material biológico em temperaturas extremamente baixas, abaixo de -80°C ou de -140°C (Baust et al., 2009). Quando o material biológico é exposto ao nitrogênio líquido, que possui temperatura de -196°C , todas as reações químicas, processos biológicos e ou atividades físicas dentro e fora da célula são suspensas (Pegg, 2007). Assim, nessas condições, células e tecidos podem ser armazenados por um período indeterminado.

O congelamento de sêmen de peixes foi obtido com sucesso pela primeira vez nos anos 50 (Blaxter, 1953), sendo usada até os dias de hoje, de forma viável para muitas espécies de peixes. Apesar disso, a variação das características seminais entre as diferentes espécies exige alterações e adaptações dos protocolos para congelação e posterior utilização do sêmen dos peixes (Zaniboni-Filho e Baldisseroto, 2015). O desenvolvimento de técnicas de criopreservação para sêmen de peixes, tem sido frequentemente utilizada com base em testes espécie-específico, apresentando resultados heterogêneos, mesmo quando comparado os resultados obtidos entre indivíduos de uma mesma espécie (Viveiros e Godinho, 2009). Os gametas dos peixes apresentam uma rápida perda de viabilidade após a espermiacção, necessitando serem prontamente utilizados. Desta forma desenvolveu-se o interesse no aprimoramento de técnicas para prorrogar da viabilidade dos gametas, consistindo principalmente na refrigeração e o congelamento (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). Enquanto a refrigeração do sêmen amplia o período de vida dos gametas por algumas horas ou dias, a criopreservação permite ampliar a viabilidade por vários anos (Billard et al., 2004).

A criopreservação envolve a diluição do sêmen em uma solução crioprotetora que deve conter um extensor, um crioprotetor intracelular e um crioprotetor extracelular para permitir o armazenamento adequado (Maria et al., 2012). Esses solutos garantem a não ativação dos espermatozoides durante o armazenamento e protegem as células espermáticas dos danos celulares, causados pela exposição a baixas temperaturas (Billard et al., 2004).

Durante o processo de criopreservação podem ocorrer danos de diferentes naturezas, e que implicam no comprometimento da viabilidade das células

reprodutivas (Figuerola et al., 2016). Esses danos ocorrem devido à formação de gelo intracelular, efeito soluções, toxicidade do crioprotetor, bem como estresse oxidativo (Aramli et al. al., 2016), levando a fatores morfológicos, bioquímicos e alterações fisiológicas que podem comprometer a qualidade espermática (Figuerola et al., 2016). De acordo com Mazur,(1984), danos celulares ocorrem por congelamento ocorrem durante a redução da temperatura para -196°C , e isso está relacionado, principalmente, a perda de 95% de água intracelular, ao aumento considerável da concentração de eletrólitos nos meios intra e extracelulares e a possível formação de cristais de gelo nos espaços intracelulares que deformam e comprimem as células, podendo destruir as estruturas intracelulares. Ainda Mazur (1984), postulou naquele momento que nas células, a água em condições isotônicas torna-se termodinamicamente instável a temperaturas inferiores a 0°C e tende a cristalizar. Para Cosson (2010), a exposição de espermatozoides a condições osmóticas extremas leva a mudanças na morfologia e capacidade de movimento. A baixa osmolaridade induz o inchaço da cabeça do espermatozoide, levando à ruptura da membrana plasmática (Poupard et al., 1997), que pode causar o enrolamento do flagelo (Ramu e Jeyendran, 2013) afetando a capacidade de fertilização.

As lesões criogênicas podem ser causadas durante o procedimento de congelamento e descongelamento, bem como pela própria diluição do sêmen (Zhang et al., 2018). Essas etapas afetam a estrutura espermática, diminuindo motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Cabrita et al., 2011). Os danos causados pelo estresse oxidativo ocorrem, principalmente, através da peroxidação lipídica na membrana celular. A criopreservação também pode afetar a estrutura e o metabolismo celular (Tirelli et al., 2005) devido à produção excessiva de EROS, comprometendo a sobrevivência celular após o descongelamento. Com o objetivo de minimizar os possíveis danos provocados pela produção de EROS durante a criopreservação, pesquisadores têm estudado os efeitos da adição de agentes antioxidantes ao meio de congelamento (Lahnsteiner e Mansour, 2010; Ögretmen et al., 2015). Por outro lado, Cabrita et al. (2011) relatam que a presença, concentração e modo de ação dessas substâncias no sêmen ocorrem de maneira específica conforme a espécie.

2.4.1. Soluções Diluidoras

Independentemente da espécie, o uso de soluções diluidoras é essencial para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento (Garcia et al., 2016). As soluções diluidoras ou meios de congelamento são compostos por sais ou açúcares, e devem ser isotônicas para inibir a ativação da motilidade espermática, e ter alta condutividade térmica para transferência rápida de temperatura (Viveiros et al., 2015). Também permite a adição de fontes energéticas, controle de pH e osmolaridade, assim como a prevenção do crescimento bacteriano (adição de antibióticos) (Bobe e Labbe, 2009).

Para os peixes nativos sul-americanos, a primeira solução diluidora utilizada foi composta apenas por uma solução salina de NaCl (Coser et al., 1984). Em geral, os diluidores possuem composição variada, as mais frequentes são as soluções isotônicas simples de glicose a 5% ou NaCl a 0,9%, ou formulações mais complexas presentes nos diluidores comerciais (Viveiros e Godinho, (2009). Dos diluidores presentes no mercado, os mais usados para conservar sêmen de peixes sul-americanos são o BTS® (Beltsville Thawing Solution) e MIII® (Merck III), porém observa-se que todos foram desenvolvidos para uso na conservação de sêmen suíno (Orfão e. al., 2010).

As proporções utilizadas na diluição do sêmen podem influenciar na qualidade do sêmen criopreservado e podem variar de acordo com a espécie e a concentração espermática (Viveiros, 2011). Na criopreservação de *Pseudoplatystoma corruscans*, foram utilizadas a proporção de diluição (sêmen:diluidor) de 1:4 (Carolsfeld et al., 2003). Para algumas espécies nativas, as proporções mais comuns estão na faixa de 1:4 a 1:9 (Murgas et al., 2014). Estudos em *C. macropomum* (Carneiro et al., 2012) e *S. brasilienses* (Zanandrea et al., 2014) indicaram taxas de diluição, respectivamente de 1:9 e 1:27, sem prejuízo para qualidade seminal.

2.4.2. Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são compostos químicos utilizados a fim de proteger as células dos danos causados durante o congelamento e descongelamento (Fahy, 2010), como a formação de cristais de gelo, o choque osmótico e os danos estruturais

nas membranas celulares, mas em concentrações elevadas também podem ser tóxicos (Elliott et al., 2017). As características ideais descritas por Fahy (2010) para um agente crioprotetor foram: baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta capacidade de atravessar a membrana celular.

Quanto à permeabilidade das membranas celulares, os crioprotetores são classificados em permeáveis e não-permeáveis (Meryman, 1971). Os crioprotetores permeáveis conseguem penetrar no interior das células e têm a função de reduzir o ponto crioscópico dos ambientes intracelular e extracelular, reduzindo a formação de micro cristais de gelo, enquanto que os crioprotetores não-permeáveis atuam no meio extracelular, estabilizando as membranas plasmáticas e auxiliando na desidratação e hidratação das células (Elliott et al., 2017).

A escolha do crioprotetor a ser utilizado no congelamento de sêmen de peixe, deve levar em consideração as características seminais das espécies, que variam entre as ordens, famílias e espécies. Para Characiformes, por exemplo, os crioprotetores que oferecem maior proteção são o dimetilsulfóxido (Me_2SO) e metilglicol (Ninhaus-Silveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2009b; Nascimento et al., 2010).

2.4.2.1. Crioprotetores permeáveis

Os crioprotetores permeáveis são substâncias orgânicas bastante solúveis e de baixo peso molecular capazes de penetrar nas células e conduzir sua ação protetora por todo o citoplasma e organelas (Hubálek, 2003). O Me_2SO é uma base de Lewis, pois ele solvata os cátions (solvatação nucleofílica) devido à alta disponibilidade dos elétrons não ligantes do átomo de oxigênio, deixando os ânions relativamente livres para reagir (Cardoso, 2011). De acordo com Fernandes et al. (2002) tem peso molecular 78 g/mol e é rapidamente permeável através das membranas. Essa característica, juntamente com presença de toxicidade reconhecidamente baixa (Stone, 1993), faz com que esteja presente em diversos estudos.

O uso de álcoois monovalentes é pouco frequente, devido à sua alta toxicidade. No entanto, Zhang et al. (2005) sugeriram que o metanol, devido ao seu baixo peso

molecular (32 g/mol) e alta taxa de permeabilidade, superando significativamente o Me_2SO , porém ressaltaram que poderia causar toxicidade em altas concentrações. Outro álcool com bom potencial crioprotetor é o propilenoglicol tem peso molecular 76 g/mol e para Aye et al., (2010) é caracterizado por uma baixa toxicidade, sendo considerado atualmente como um composto não-genotóxico ou carcinogênico. Já o glicerol, que também é um composto orgânico pertencente à função álcool de massa molecular 92 g/mol, é usado como crioprotetor. Na década de 50, esta substância começou a ser utilizada na criopreservação de células e micro-organismos (Levine & Marquardt, 1955). Para Parks e Graham (1992), o glicerol tem por característica, além do efeito osmótico, atuar diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que se liga aos fosfolípidios presentes na cabeça espermática, reduzindo a fluidez da membrana e interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana. Outro químico utilizado como crioprotetor é o etilenoglicol é um álcool com dois grupos-OH, um composto químico largamente utilizado como um anticongelante automotivo (CETESB, 2014). Na sua forma pura é um composto inodoro, incolor, xaroposo líquido de sabor doce e com massa molecular 62 g/mol (Fernandes et al., 2002). O etilenoglicol surgiu como alternativa, devido a sua capacidade crioprotetora, determinando das membranas espermáticas de espermatozoides, sendo considerado menos tóxico quando comparado ao glicerol (Aguiar et al., 2012). O Metilglicol com peso molar de 76g/mol tem sido, juntamente com Me_2SO , um dos crioprotetores mais utilizados para a maioria das espécies nativas de peixes, com vários registros observados (Murgas et al., 2014). Viveiros et al. (2015), sugere o metilglicol como melhor crioprotetor permeável para curimba (*P. lineatus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com taxas de motilidade, respectivamente de 63 e 72%, e de células viáveis, respectivamente de 57 e 68% (Viveiros et al., 2015).

Amidas, como a dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF) e metilformamida (MF) têm sido utilizadas como crioprotetores penetrantes em diluentes para congelamento de sêmen de diversas espécies, incluindo peixes *C. macropomum* (Varela Junior et al., 2012), *Prochilodus magnalena* (Atencio et al., 2013), *Sorubim cuspicaudus* (Pardo-Carrasco et al., 2015) e *B. orbignyanus* (Perry et al., 2019). A justificativa para a eficiência das amidas como crioprotetor, foi definida por Baulny et al. (1999). Estes autores, ressaltaram que o efeito crioprotetor das amidas é imputável ao seu baixo peso molecular e viscosidade, que lhes fornecem grande permeabilidade

da membrana, reduzindo a ocorrência de dano celular causado por estresse osmótico, já que quando um crioprotetor penetrante atravessa as membranas celulares mais lentamente do que a água, faz com que o volume da célula seja reduzida ou expandida além de sua capacidade máxima, quando o crioprotetor é adicionado ou removido, respectivamente.

De todo modo, é importante ressaltar que os efeitos tóxicos dos crioprotetores são próprios de cada agente e apresentam diferentes efeitos físico-químicos e osmóticos (Fahy et al., 2004). As estratégias para o uso de crioprotetores menos tóxicos e/ou a combinação de dois ou três, foi sugerida por Vajta & Nagy, (2006) nos procedimentos de criopreservação.

2.4.2.2. Crioprotetores não permeáveis

Os crioprotetores impermeáveis são açúcares (sacarose e a lactose) ou proteínas, que por serem moléculas com grandes dimensões, não conseguem penetrar no interior das células (Hovatta, 2005). A características hidrofílica (ligam-se às moléculas de água) aumenta a viscosidade da solução e diminuindo a formação de cristais de gelo (Fahy, 2007). De acordo com Best (2015), os açúcares também podem reduzir a toxicidade química dos crioprotetores, pois o aumento da viscosidade permite que se reduza a concentração de crioprotetor e, portanto, a toxicidade. A glicose é o açúcar mais comumente utilizado como crioprotetor impermeável em várias espécies tais como: *Brycon amazonicus* (Cruz Casallas et al., 2006); *Brycon moorei* (Atencio-Garcia et al., 2017); *B. orbignyanus* (Galo et al., 2011); *Prochilodus brevis* (Nunes et al., 2019); *P. lineatus* (Viveiros et al., 2010) e *S. cuspicaudus* (Pardo-Carrasco et al., 2015).

Os efeitos da gema de ovo na estabilização de membrana já são bem conhecidos na criopreservação de espermatozoides (Maria et al., 2006). Todavia, a gema de ovo é formada por lipoproteínas, livetinas e fosvitinas, encontradas em duas frações facilmente separáveis pelo método de centrifugação: o grânulo e o plasma. Neves e Henry (2012) acreditam que as lipoproteínas de baixa densidade, presentes no plasma, sejam as responsáveis por sua ação crioprotetora.

Além dos crioprotetores já citados, há o uso BTS®, um diluidor que possui em sua composição 80% de glicose, desenvolvido primeiramente para o sêmen de suínos, tem sido amplamente utilizado como diluente para sêmen de peixes sul-americanos com resultado superiores a outros diluidores (Viveiros et al., 2009b). Dentre as espécies que o BTS® foi usado como diluidor, podem ser citadas *B. orbignyanus* (Maria et al., 2006), *P. mesopotamicus* (Streit Jr et al., 2006), *S. brasiliensis* (Viveiros et al., 2009a), *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009b), *C. macropomum* (Varela Jr, et al., 2012).

2.5. Criopreservação de espécies neotropicais sul-americanas

Um dos primeiros trabalhos testando criopreservação em sêmen de espécies neotropicais sul-americanas foi descrito por Coser et al. (1984), usando as espécies *P. scrofa* e *S. maxillosus*. Desde então, a avaliação dos parâmetros qualitativos pós congelamento vem sendo avaliada por diversos autores e variadas espécies. No decorrer das décadas de 80 e 90, estudos para criopreservação de sêmen de espécies neotropicais em diferentes gêneros já foram publicados, como: *Leporinus silvestri* (Coser et al., 1987), *P. mesopotamicus* (Carosfeld et al, 1990, Silveira et al., 1990, Kavamoto et al., 1998), *P. lineatus* (Kavamoto et al., 1989), *Rhamdia* (Silveira et al., 1985).

Durante os anos 2000 houve um aumento significativo de estudos e publicações testando criopreservação em espécies sul americanas, especialmente nos últimos 10 anos. Como exemplos de estudos testando crioprotetores nestas espécies podemos citar Viveiros et al. (2015a), que observaram o efeito dos crioprotetores metanol, metilglicol e Me₂SO a 10% de inclusão, em duas espécies de peixes neotropicais (*B. orbignyanus* e *P. lineatus*), obtendo motilidade acima de 60%, para ambas espécies utilizando metilglicol, e para *P. Lineatus* também com metanol. Os autores atribuíram esse resultado a baixa osmolaridade desses crioprotetores, diminuindo assim a ocorrência de choque osmótico. Resultados similares aos do estudo anterior para taxa de motilidade foram reportados para *B. insignis* (Viveiros et al., 2011), *C. macropomum* (Carneiro et al., 2012), *P. lineatus* (Vasconcelos, et al, 2015a) e *Steindachneridion scriptum* (Pereira et al., 2019). Em tambaqui (*Colossoma macropomum*), os crioprotetores Me₂SO e DMF foram escolhidos, apresentando taxas

de motilidade e de células viáveis de 50%, e mesmo com parte dos espermatozoides danificados, as taxas de fecundação (91%) e de eclosão (87%) não foram afetadas pelo congelamento (Varela et al., 2012; Varela et al., 2015). Em sêmen criopreservado de *B. orbignyianus*, Perry et al., (2019) obtiveram taxa de motilidade e integridade celular superior a 70 e 80%, respectivamente com uso de DMA.

2.6. Revisão sistemática e meta-análise

A revisão sistemática (RS) da literatura é caracterizada por Castro (2001), como um estudo secundário, que tem por objetivo reunir estudos semelhantes, publicados ou não, avaliando-os criticamente em sua metodologia e reunindo-os numa análise estatística, a meta-análise, quando isto é possível. Por sintetizar estudos primários semelhantes e de boa qualidade é considerada o melhor nível de evidência para tomadas de decisões (Atallah e Castro, 1998).

Por isso, sintetiza os resultados de estudos originais utilizando estratégias para diminuir a ocorrência de erros aleatórios e sistemáticos (Berwanger et al., 2007), reduzindo possíveis vieses que ocorreriam em uma revisão tradicional. Para evitar viés de análise na revisão sistemática, os métodos de seleção e análise dos dados são estabelecidos antes de a revisão ser conduzida, num processo rigoroso e bem definido. A revisão sistemática inicia-se com a elaboração da questão clínica, ou seja, o objetivo principal, e de um projeto de revisão (Castro, 2001). A seguir é realizada uma ampla busca da literatura com o objetivo de se identificar o maior número possível de estudos relacionados à questão. Uma vez selecionados, aplicam-se critérios para avaliação da qualidade metodológica conforme o delineamento do estudo original. Como as revisões realizadas pela Colaboração Cochrane avaliam efetividade de intervenções, apenas ensaios clínicos controlados, em sua maioria randomizados, são incluídos. Quando os estudos forem semelhantes, os resultados podem ser finalmente sintetizados numa meta-análise (Mulrow, 1994).

A meta-análise é a análise estatística de resultados de diferentes estudos individuais, com o objetivo de integrá-los, combinando e resumindo seus resultados (Stroup et al., 2012). Sua importância se dá por reduzir, por exemplo, o desvio padrão e o intervalo de confiança, tornando o resultado mais confiável, além de possibilitar a

inclusão de futuros estudos que venham a ser publicados através da meta-análise cumulativa (Moher et al.,2009).

Apesar da segurança que a meta-análise transmite às revisões sistemáticas, para que ela seja aplicável, os dados precisam ser agrupáveis e padronizados, para então serem integrados. Caso contrário, a não observação desses requisitos pode gerar dados não confiáveis. A revisão sistemática juntamente com a meta-análise, têm contribuído para a pesquisa na produção animal. Essas análises funcionam como uma importante ferramenta para sintetizar o efeito dos tratamentos, particularmente quando as respostas apresentam grande variabilidade, seja por sua natureza biológica ou por demandarem um elevado número amostral (Cernicchiaro et al., 2016).

3. Hipóteses do Trabalho

O uso de técnicas de criopreservação influencia na qualidade de gametas masculinos de espécies neotropicais de peixes.

Os estudos publicados na literatura apresentam técnicas que propiciam a conservação de gametas masculinos criopreservados, sem causar danos que afetem severamente sua viabilidade pós descongelamento.

4. Objetivos

4.4. Objetivo Geral

Realizar uma revisão sistemática e quantificar, por meio de uma meta-análise, dados disponíveis na literatura sobre o impacto da criopreservação nos parâmetros de qualidade (motilidade, tempo de motilidade e anormalidade espermáticas) do sêmen de espécies neotropicais sul-americanas.

4.5. Objetivo específicos

I. Realizar uma revisão sistemática sobre o uso de crioprotetores na conservação de sêmen espécies neotropicais.

II. Criar um banco de dados sobre estudos com criopreservação de gametas masculinos em peixes neotropicais.

III. Identificar principais efeitos do uso de diferentes crioprotetores sobre a qualidade dos gametas, pós criopreservados.

Capítulo II¹
Motilidade de sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-
americanos: meta-análise

¹Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*.

**Motilidade de sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos:
meta-análise**

Paula Graziela Lassen^{a*}

^aAquam Research Group, Department and Program of Animal Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

Corresponding author email: p.g.lassen@gmail.com

Motilidade de sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos: meta-análise

Revisão sistemática e meta-análise (MA) foram realizadas para resumir as evidências científicas dos efeitos da criopreservação do esperma de espécies sul americanas de peixes de água doce no indicador de taxa de motilidade. A estratégia de busca foi aplicada em quatro bases de dados eletrônicas, sendo os critérios de inclusão estudos realizados com peixes neotropicais cujos sêmen foi submetido à criopreservação. MA para efeitos aleatórios foi realizada para cada indicador separadamente com a média geral do sêmen fresco (controle) e criopreservado (tratado). Um total de vinte e cinco publicações relatando vinte e seis estudos e 116 ensaios foram incluídos na MA. Foi observada heterogeneidade entre os estudos em todas as variáveis. Em geral, o sêmen criopreservado apresentou motilidade significativamente inferior ao sêmen fresco. A motilidade aumenta ($P=0,00$) com maior proporção de diluição do sêmen. Nossos resultados sugerem que a criopreservação com o uso de crioprotetores álcoois e amidas parecem favorecer taxas de motilidade do sêmen criopreservado de espécies neotropicais sul-americanas de água doce.

Palavras-chave: criopreservação, sêmen, peixes neotropicais, qualidade espermática, motilidade

Introdução

A criopreservação é uma técnica que permite o armazenamento de gametas em temperaturas extremamente baixas, normalmente em nitrogênio líquido a -196°C , conservando a viabilidade funcional e estrutural por longos períodos (Jang et al., 2017). A técnica permite conservar o sêmen de alta qualidade coletado durante a desova, e disponibilizar ao longo do ano, especialmente para uso em outras estações reprodutivas, melhorando a eficiência produtiva (Zhang et al., 2018). Entretanto, esta técnica causará, em maior ou menor grau, uma diminuição nos parâmetros qualitativos de espermatozoides em diferentes espécies (Muchlisin et al., 2004; Adames et al., 2015; Zhang et al., 2018; Da Costa et al., 2019). Para estabelecer uma tecnologia bem-sucedida de criopreservação, alguns fatores

essenciais precisam ser avaliados, incluindo o agente crioprotetor, composição do diluente, concentração de crioprotetor e taxa de diluição (Suquet et al., 2000; Liu et al., 2006).

A motilidade espermática é um índice essencial para estimar a qualidade dos espermatozoides frescos e criopreservados e, geralmente, após a criopreservação observa-se uma porcentagem menor de motilidade (Liu et al., 2006; Zhang et al., 2018). A diminuição da motilidade foi comprovada no sêmen de *Colossoma macropomum* (Varela Jr. et al., 2012; Melo-Maciel et al., 2015), *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al., 2011; Vasconcelos et al., 2015), *Piaractus brachypomus* (Navarro et al., 2004; Ramirez-Merlano et al., 2011), *Piaractus mesopotamicus* (Galo et al. 2019), dentre tantas outras espécies de neotropicais sul-americanas após a criopreservação. Porém, dentro desta ampla literatura observa-se uma variabilidade de protocolos e testes, bem como divergência entre resultados sobre a influência dos tratamentos na motilidade. A integração de resultados de muitos estudos, usando revisão sistemática (RS) e meta-análise (MA), pode fornecer uma estimativa igualmente imparcial do efeito de tratamento, com um aumento na precisão (Egger et al., 2001; Borenstein et al., 2009).

A revisão sistemática (RS) busca responder a uma pergunta de pesquisa mediante o uso de métodos transparentes e sistemáticos (Castro, 2001), sintetizando resultados de estudos originais e utilizando estratégias para diminuir a ocorrência de erros aleatórios e sistemáticos (Berwanger et al., 2007). Desse modo, a RS aliada a meta-análise (MA) e a meta-regressão (MR) têm contribuído para a pesquisa na produção animal. A importância desta metodologia é reforçada por Cernicchiaro et al. (2016), onde afirmam que essas análises são particularmente importantes quando as respostas apresentam grande variabilidade, seja por sua natureza biológica ou por demandarem um elevado número amostral.

O objetivo deste estudo foi realizar uma RS-MA sobre o impacto da criopreservação nos parâmetros de motilidade e tempo de motilidade do sêmen de espécies neotropicais de peixes.

Material e métodos

Pesquisa e fonte de dados

Esse estudo buscou identificar os efeitos da criopreservação sobre os parâmetros de motilidade e tempo de motilidade em sêmen de peixes de espécies neotropicais de água doce. A pergunta da RS foi definida com base nos termos do PICO: A população (P) estudada foi espécies neotropicais de peixes de água doce; a intervenção (I), uso da criopreservação em amostras de sêmen dessas espécies; e os resultados (O) de interesse, a qualidade espermática pré e pós criopreservação. Os grupos de comparação (C) consistiam nos dados de qualidade obtidos antes e após a intervenção, em diferentes espécies de peixes neotropicais de água doce.

Neste estudo, apresentamos os dados relativos as variáveis de motilidade pré e pós-intervenção, avaliadas subjetivamente e digitalmente. Segundo Lahnsteiner et al. (1998), motilidade é um parâmetro importante que descreve a funcionalidade da célula espermática, uma vez que nos teleósteos é intimamente relacionados à fertilidade (Fig. 1).

Métodos de busca para identificação dos estudos

Uma lista de termos e algoritmos foi sumarizada com base na população, intervenção e resultados. As palavras-chave utilizadas na estratégia de busca na literatura foram: (fish*) AND (cryopreserv* OR criopreserv* OR freez* OR Cool* OR frost* OR froz* OR Chill* OR vitrific*) AND (sperm* OR semen*) (Tabela 1).

As buscas eletrônicas foram realizadas por meio de bancos de dados CAB Direct (Springer Nature, 1973-2019), Pub Med (MEDLINE, 1940-2019), Scopus (Elsevier, 1960-2019) e ISI Web of Science (Thomson Reuters, 1900-2019), com o uso da opção de

vocabulário controlado quando disponível. A busca foi realizada em julho de 2018 e atualizada em agosto de 2019. Foram realizadas buscas adicionais, utilizando artigos de revisão já publicados.

Os resultados da pesquisa foram exportados para um gerenciador bibliográfico (Mendeley, Elsevier) e citações duplicadas foram removidas. Nenhuma restrição de ano de publicação e de idioma foi aplicada neste momento.

Seleção dos estudos

Os estudos foram incluídos ou excluídos da RS com base em formulário padronizado, adaptado de trabalhos já publicadas (Mederos et al. 2012; Canozzi et al., 2017). Antes, uma triagem inicial das citações, mediante leitura do título, buscando eliminar estudos que não utilizaram peixes neotropicais como objeto de pesquisa.

Quatro revisores previamente treinados realizaram uma segunda etapa de triagem de relevância, com o uso de 30 resumos, o que serviu para auditar o processo de revisão. Uma última etapa foi conduzida de forma independente por dois revisores, avaliando o título, o resumo e as palavras-chave utilizando as seguintes perguntas:

- (1) Este é um estudo primário de intervenção experimental?
- (2) É realizado com peixes neotropicais?
- (3) É avaliado, pelo menos, uma das seguintes intervenções: criopreservação ou uso similar de conservação de esperma de peixe?

Os estudos foram excluídos se ambos os revisores concordassem que o estudo não cumpria um ou mais desses critérios. Na existência de conflitos, os mesmos foram resolvidos por consenso entre os dois revisores. Caso não solucionado, a citação era enviada para um terceiro revisor.

Extração e manipulação de dados

O formulário de extração de dados (ED) foi adaptado de estudos anteriores e foi realizada pelo primeiro autor. Se as publicações relatassem mais de um estudo, os dados de cada estudo eram coletados separadamente. Antes da avaliação do risco de viés e da ED, a relevância de trabalhos selecionados através de triagem inicial foi confirmada com o uso do artigo completo com base no idioma (inglês, espanhol ou português); na existência de um grupo controle apropriado ou uso de amostras antes e depois intervenção; nas informações detalhadas para conduzir a ED quantitativos para realizar a MA. Nesta fase, a pesquisa foi restrita a publicações nestes idiomas, que os integrantes da equipe de pesquisa eram fluentes.

Os detalhes do estudo incluíram população, intervenção, medidas de resultado, resultados e informações do manuscrito, como nome, autor (es), ano de publicação e idioma original. As características populacionais foram espécie, local de realização (fazenda comercial ou de pesquisa), idade média, método de indução hormonal (extrato de carpa pituitária ou outro) e operador (produtor ou pesquisador). Os dados obtidos para os grupos controle e tratado foram coletados em percentagem (%) para a variável motilidade. Para cada resultado, buscamos reunir as seguintes informações: média, desvio padrão (s.d.) ou qualquer medida disponível de dispersão, unidade de medida, valor de p e número de animais nos grupos controle e tratado. Grupo controle faz referência aos valores obtidos de amostras de sêmen fresco e grupo tratado, aos do sêmen pós-criopreservação.

As informações relativas ao crioprotetor utilizado foram estratificadas em dois grupos: 1) tipo de crioprotetor: base, álcool ou amida; 2) nível de inclusão: baixo (até 7%), médio (de 7 a 14%) e alto (acima de 14%). Além destes grupos, foi analisada a influência do crioprotetor específico e a percentagem de inclusão na solução. Para a classificação por tipo de crioprotetor dimetilsulfóxido (Me₂SO), foi considerado base segundo classificação descrita por Cardoso (2011), onde é denominado uma base de Lewis, pois ele solvata os cátions

(solvatação nucleofílica) devido à alta disponibilidade dos elétrons não ligantes do átomo de oxigênio, deixando os ânions relativamente livres para reagir.

Os desfechos foram extraídos como medidas contínuas com a média para cada grupo (controle e tratado) e desvio padrão ou outra medida de dispersão. Caso isso não estivesse disponível, eram coletadas medidas de associação com erro padrão ou intervalo de confiança a 95%. Foram coletados o número de animais em cada estudo, se utilizados pool ou amostras individuais para obtenção de alíquotas, número total de amostras, o número de replicadas utilizadas em cada tratamento e metodologia para avaliação (subjéitiva ou digital).

Resultados mencionados para os grupos controle e tratado com erro padrão da média (SEM_{ρ}), foi utilizada a seguinte fórmula na transformação para desvio padrão (Mederos et al., 2012, Canozzi et al., 2019):

$$S_{\rho} = SEM_{\rho} \times \sqrt{n_{\rho}}$$

onde S_{ρ} é o desvio padrão calculado e n_{ρ} é o número de amostras utilizadas nos grupos de tratamento e controle.

Quando os resultados foram apresentados como gráficos, o autor correspondente foi contatado por correio eletrônico e solicitado a fornecer as estatísticas resumidas. Se a informação não era disponibilizada, o artigo era excluído.

Avaliação do risco de viés

A avaliação do risco de viés foi testada em quatro estudos pré-selecionados para testes de ED. O risco de viés foi avaliado com o uso da ferramenta da *Cochrane Collaboration* para avaliar o risco de viés em ensaios randomizados (Higgins et al., 2011), com a adição de uma avaliação, a do relato de randomização (além da geração de sequência aleatória). Todos os desfechos foram avaliados manualmente pelo primeiro autor.

Meta-análise

O pacote estatístico Stata (StataCorp., College Station, TX, EUA) foi utilizado para analisar cada resultado por diferença de médias entre os grupos controle e tratado com intervalo de confiança a 95% (IC 95%). Os resultados da MA e meta-regressão foram realizadas a partir da prévia suposição de existência de heterogeneidade entre os estudos (Der Simonian e Laird 1986). As diferenças foram consideradas significativas em $P < 0,05$ e as tendências foram definidos em $0,05 \leq P < 0,1$. A magnitude de I^2 foi considerada baixa, moderada ou alta heterogeneidade quando valores estavam na ordem de 25%, 50% e 75%, respectivamente (Higgins et al. 2003).

Análise de subgrupos. Foram realizadas com conjuntos de dados que consistiam em, pelo menos, dois estudos individuais que investigassem tratamentos semelhantes avaliando o mesmo resultado. Os resultados da MA foram apresentados em diferença média combinada (DM) e IC 95%. O Q de Cochran (teste qui-quadrado para heterogeneidade) e I^2 (porcentagem da variação total entre estudos devidos à heterogeneidade e não ao acaso) foram obtidos com base nos subgrupos tipo de crioprotetor (Base, álcool e amida), crioprotetor utilizado (Me_2SO , dimetilacetamida, dimetilformamida, etilenoglicol, glicerol, metanol, metilformamida, metilglicol e propilenoglicol) e nível de inclusão (baixo, médio e alto).

Viés de publicação

O viés de publicação foi avaliado na forma gráfica (gráfico de funil) e estatística (testes de correlação de Begg e de regressão de Egger) para cada um dos dois resultados de interesse. Viés foi considerado presente com base na avaliação visual do gráfico e se, pelo menos, um dos testes estatísticos fosse significativo ($P < 0,10$). Na evidência de viés, o método " 'trim-and-fill'" foi usado para estimar e corrigir um eventual viés de publicação (Duval e Tweedie 2000).

Meta-regressão

Análise de meta-regressão univariada para efeitos aleatórios considerou os efeitos de (1) randomização (mencionada, descrita ou não reportada), (2) fatores de confusão identificados e controlados (não, sim ou não aplicável), (3) ano de publicação do manuscrito, (4) país, (5) estação do ano, (6) família (*Bryconidae*, *Serrasalminae*, *Pimelodidae*), (7) gênero (*Brycon*, *Piaractus*, *Rhamdia*), (8) quem realizou o procedimento (não reportado, produtor, pesquisador), (9) tipo de crioprotetor (base, álcool ou amida), (10) crioprotetor interno, (11) nível de inclusão, (12) tamanho da amostra em cada resultado de interesse. As variáveis foram analisadas separadamente devido ao baixo número de estudos disponíveis para cada desfecho de interesse.

Meta-análise cumulativa e Análise de sensibilidade

A MA cumulativa busca avaliar o efeito na DM toda vez que um novo resultado potencial é publicado. Essas análises são realizadas com mais frequência para exibir o padrão da evidência ao longo do tempo (Borenstein et al., 2009). A análise de sensibilidade busca determinar se um determinado estudo tem um efeito substancial no DM através da retirada manual de um estudo por vez e avaliação se o DM apresenta variação maior de $\pm 30\%$ com a sua remoção. Após, é realizada a sua reinserção e a remoção do próximo estudo, e assim sucessivamente.

Resultados

Identificação de estudos e extração de dados

A pesquisa bibliográfica identificou 3.639 citações. Dessas, 97 foram identificados como citações úteis com probabilidade de conter dados, vinte e cinco foram consideradas como elegíveis e foram incluídos para avaliação da solidez metodológica e extração de dados (Fig. 1; Tabela 2). Dos quinze autores contatados que apresentaram seus resultados graficamente ou sem dados suficientes nos estudos publicados, dois retornaram com dados

numéricos das análises. Das publicações avaliadas incluídas nesta MA, doze estavam em idioma inglês, sete em espanhol e cinco em português, sendo conduzidos no Brasil (n=14) e na Colômbia (n=11).

Foram obtidos 26 estudos sobre motilidade, o número total de peixes utilizados para os estudos que avaliaram a motilidade foram 420. No total, vinte e cinco publicações foram incluídas neste RS-MA que compreendeu 26 estudos e 116 comparações únicas de tratamento. A tabela 3 lista as características dos estudos incluídos.

Risco de viés

Os estudos incluídos na RS foram deficientes em fornecer descrições suficientemente detalhadas para a realização de uma avaliação de potencial risco de viés. O viés de desempenho (Tabela 4) não era claro em 100% dos estudos que analisaram motilidade, e a abordagem de cegamento não foi relatada em nenhum momento, aumentando o risco de viés de detecção. Para o risco de viés de atrito, esse domínio foi baixo para todos os estudos incluídos. A caracterização metodológica dos estudos incluídos pode ser observada na Tabela 5.

Análise de subgrupos

Vinte e cinco publicações relatando estudos controlados, descrevendo 26 estudos e 116 ensaios foram incluídos na MA de subgrupos. Não houve exclusões devido à falta de aleatorização ou falta de ajuste para agrupamentos e fatores de confusão. O número publicações, estudos, ensaios e tipo de medições de resultados disponíveis para as análises estatísticas são apresentados na tabela 6, para a variável de motilidade.

O efeito do tipo de crioprotetor foi obtido em todos os 116 ensaios. Para todos os tipos de crioprotetores (base, álcool e amida) avaliados, a motilidade do sêmen fresco foi maior que o criopreservado, com uma DM geral de 6,63% de motilidade espermática (n = 116 ensaios; IC 95%= 6,11; 7,16; P =0,00) e alta heterogeneidade ($I^2=92,3\%$). Independe do nível do

crioprotetor (baixo, médio e alto), a motilidade do sêmen fresco foi significativamente maior (n = 116 ensaios; DM= 6,63%; IC 95%= 6,11; 7,16; P =0,00) em relação aos peixes do grupo criopreservado, com alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 93,2\%$).

Efeito do uso de álcoois na criopreservação.

A variação da diferença média do uso de álcoois na criopreservação atribuído a heterogeneidade foi alta ($I^2 = 93,5\%$). Doze ensaios foram combinados, testando álcoois em baixas concentrações nas soluções de criopreservação, e todos apresentaram resultados significativamente inferiores para o sêmen criopreservado, com moderada a alta heterogeneidade. Dos 26 ensaios testando álcoois em concentrações médias nas soluções de criopreservação, todos apresentaram resultados significativamente inferiores nos grupos criopreservados, comparados ao sêmen fresco. Os ensaios com inclusão em altas concentrações também os resultados foram significativamente inferiores para motilidade. As comparações utilizando etilenoglicol ($I^2 = 95,7\%$ e $P = 0,02$) e metanol ($I^2 = 61,8\%$; $P = 0,00$), em especial, apresentaram a motilidade significativamente inferior no sêmen de peixes criopreservados em relação ao sêmen fresco, com alta e moderada heterogeneidade, respectivamente, entre os estudos.

Crioprotetor amida e motilidade.

A variação da DM da motilidade dos espermatozóides (n=18 estudos; DM= 4,27%; IC95% 3,41; 5,14; P=0,00) quando do uso de amidas na criopreservação atribuído a heterogeneidade, foi alta ($I^2 = 94,2\%$). Ensaios com crioprotetores do tipo amida a DM foi significativa para motilidade, quando em níveis médios de inclusão (n=12 ensaios ou estudos). Especificamente os ensaios envolvendo o DMA, os resultados foram significativos para nível médio de inclusão, e a motilidade no grupo sêmen fresco foi superior em relação ao

sêmen criopreservado com amidas, com alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2=96,0\%$; $P=0,00$).

Crioprotetor Me_2SO e motilidade.

Foi observada alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2=92,3\%$; $P=0,00$). Níveis baixos deste crioprotetor na solução crioprotetora, apresentaram uma DM de 8,51% ($n=28$ ensaios; $IC95\%=6,04; 10,98$; $P=0,00$) com alta heterogeneidade ($I^2=87,5\%$ $P=0,00$). No nível médio de inclusão, os ensaios com motilidade apresentaram alta heterogeneidade ($I^2=91,1$; $P=0,00$), bem como em níveis altos ($I^2=86,3\%$; $P=0,00$). Independentemente do nível de inclusão, a motilidade espermática foi sempre superior no sêmen fresco.

Viés de publicação.

Os estudos incluídos nesta MA apresentaram alta heterogeneidade, por isso os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela. Para motilidade, o gráfico de funil evidenciou a presença de algum tipo de viés, assim como teste de Egger ($P=0,00$) e Begg ($P=0,00$). O teste “trim e fill” imputou 34 estudos (Fig. 2).

Análise de meta-regressão

Os vinte e seis estudos extraídos dos 25 artigos apresentaram 93,20% da heterogeneidade devido ao acaso. O ano de publicação, nível, tipo e a proporção de diluição do crioprotetor são variáveis que reduzem a variância total entre os estudos e influenciam a motilidade. Para o aumento de uma unidade no ano, o valor predito da motilidade reduz a um nível de 0,37. O nível alto do crioprotetor aumenta a motilidade em 14,64%. Crioprotetores do tipo álcool e amida apresentaram resultados melhores comparados a base, porém não foram significativos. O aumento de uma unidade na proporção diluição aumenta o valor predito da motilidade a um nível de 0,56% (Tabela 7).

Meta-análise cumulativa e Análise de sensibilidade

Na MA cumulativa sobre motilidade não ficou evidente a influência do tempo nos resultados. Assim como a retirada manual de estudos na análise de sensibilidade, não influenciou na diferença média geral.

Discussão

Esta é a primeira revisão sistemática e meta-análise que avaliou a influência da criopreservação nos índices percentuais de motilidade e no tempo de motilidade de espermatozoides de espécies neotropicais de peixes sul-americanas. O primeiro estudo publicado com criopreservação de sêmen de espécies neotropicais foi realizado no início dos anos 80, por Coser et al. (1984) e desde então, contáveis estudos vêm sendo desenvolvidos. Segundo Viveiros e Godinho (2009), no decorrer dos anos estudos com base em testes espécie-específico, vem apresentando resultados heterogêneos até mesmo quando conduzidos em uma mesma espécie dos peixes neotropicais sul-americanos.

Apesar do grande número de publicações identificadas em nossa pesquisa, a quantidade de estudos que forneceram dados para uma análise quantitativa foi menor que o esperado. A maioria das publicações incluídas foram publicadas na última década, mostrando um aumento nos estudos utilizando criopreservação para as espécies neotropicais sul-americanas a partir de 2010, principalmente no Brasil. Porém, apesar desta distribuição, a MA cumulativa não detectou influência cronológica dos estudos, para os parâmetros de motilidade e tempo de motilidade.

As espécies de interesse nesta RS se concentraram nas famílias *Bryconidae*, *Prochilodontidae*, *Serralminae* e *Pimelodidae*, representantes das duas ordens mais expressivas de peixes neotropicais, Characiformes e Siluriformes (Reis, 2016). Grande parte dessas publicações (n=21) os autores utilizaram como crioprotetor permeável, Me₂SO na composição da solução crioprotetora, em pelo menos um teste. Dentre as espécies testadas a maioria foi em Characiformes, e com diferentes concentrações de Me₂SO, como por exemplo:

5, 10 e 15% (Navarro et al., 2004; Cruz-Casallas et al., 2004; Atencio et al., 2017); 5% (Fresneda et al., 2004); 5, 10, 15 e 20% (Varela Jr et al., 2012); 10% (Streit et al., 2009; Galo et al., 2011; Atencio et al., 2015; Nascimento et al., 2017; Galo et al., 2019; Nunes et al., 2019). Por outro lado, o Me₂SO, teve desempenho inferior nos estudos que foi comparado com os crioprotetores do tipo álcool e amida nas espécies: *B. insignis* (Viveiros et al., 2011); *C. macropomum* (Varela Jr. et al., 2012b); *B. henny* (Restrepo-Betancourt et al., 2017) *P. brevis* (Nunes et al., 2019). Cabe ressaltar que os estudos incluídos nesta MA apresentaram problemas ou ausência de descrição para justificativas de tamanho de amostra, aleatorização de tratamentos e cegamento dos procedimentos. Conforme apresentado nos resultados, houve um risco variável de viés para os resultados, o que já era esperado devido a diversidade de espécies e crioprotetores avaliados.

Efeito da criopreservação sobre a motilidade

A motilidade é um parâmetro importante que descreve a funcionalidade da célula, uma vez que nos teleósteos está intimamente relacionado à fertilidade (Lahnsteiner & Mansour, 2010). De acordo com Figueroa et al. (2016) depende de diversos aspectos, como estado fisiológico da célula, mitocôndrias, produção de ATP, integridade do canal da membrana plasmática e estrutura do flagelo. O sêmen criopreservado possui uma porcentagem de motilidade mais baixa em relação ao fresco (Zhang et al., 2018) e, dependendo da espécie, a motilidade resultante após a criopreservação do sêmen pode apresentar variação de 10 a 100% das células móveis (Figueroa et al., 2016). Em nossa MA sobre a taxa de motilidade, todas as comparações (n=116), favoreceram significativamente o sêmen fresco quando comparado ao criopreservado.

A maior presença do Me₂SO nas publicações avaliados está de acordo com a observação de Atencio et al. (2013), em afirmarem que o baixo peso molecular (78g/mol) deste crioprotetor permeável, o transformou no crioprotetor mais usado para sêmen de

teleósteos. Seguramente este fato levou Carosfeld et al. (2003), propor protocolos para cinco espécies de Characideos (*P. mesopotamicus*, *P. lineatus*, *B. orbignyanus*, *S. maxillosus* e *L. elongatus*) com resultados satisfatórios. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura considerada em nossa MA para as espécies, *C. macropomum* (Varela Jr. et al., 2012; Varela Jr. et al., 2015); *B. moorei* (Atencio et al., 2017); *P. brachypomus* (Navarro et al., 2004; Ramirez-Merlano et al., 2011); *P. brevis* (Nascimento et al., 2017; Nunes et al., 2019) e *P. magdalenae* (Martinez et al., 2012; Atencio et al., 2015). Em comum para todas estas espécies, o protocolo de criopreservação continha a glicose. Para as espécies de *B. amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006) e *P. brachypomus* (Fresneda et al., 2004), a inclusão de Me₂SO também foi satisfatória para as taxas de motilidade, porém em uma concentração de apenas 5%. O Me₂SO esteve presente em maior número nos estudos avaliados em nossa MA, figurando em 22 estudos e em 53 das 116 comparações entre crioprotetores.

Em quarenta e três comparações, contidas em 12 estudos, o álcool foi utilizado como crioprotetor permeável, nas apresentações: metanol (32g/mol), glicerol (92g/mol), etilenoglicol (62 g/mol), propilenoglicol (76g/mol) e metilglicol (76g/mol). Apesar do uso do álcool monovalente como agente crioprotetor ser pouco frequente, em função de sua alta toxicidade, Zhang et al. (2005) sugeriram metanol, por apresentar baixo peso molecular, por possuir alta taxa de permeabilidade, superando significativamente o do Me₂SO.

A motilidade espermática do sêmen de sete espécies, foram avaliadas nos ensaios analisados com crioprotetores do tipo álcool. Os resultados foram considerados pelos autores dos estudos, satisfatórios em duas delas, *B. insignis* e *P. brachypomus*, com 10% dos crioprotetores metilglicol e metanol, respectivamente. A explicação proposta por Ramirez-Merlano et al. (2011) para o sucesso no uso do metanol para *P. brachypomus*, está relacionado com a sua provável capacidade de entrar e sair das células, baseado no gradiente de concentração, mantendo a integridade de membrana e funções mitocondriais durante o

processo de criopreservação. Isso, pode perfeitamente justificar o resultado observado na MR para este tipo de crioprotetor interno. Quanto ao gênero *Brycon*, a baixa osmolaridade e por consequência a diminuição da ocorrência de choque osmótico dos álcoois em 10% de concentração, é a justificativa de Viveiros et al. (2015) para a melhor motilidade do *B. orbignyianus*, em relação ao Me₂SO a 10%. Resultados similares foram reportados na literatura para *C. macropomum* (Carneiro et al., 2012) *P. lineatus* (Viveiros et al., 2015) e *Steindachneridion scriptum* (Pereira et al., 2019).

O uso de amidas (DMA, DMF e MF) na criopreservação foi observado em apenas três estudos, totalizando dezoito comparações. Três espécies foram testadas com esta classe de crioprotetor intracelular, *C. macropomum*, (Varela Jr. et al., 2012b); *P. magdalena* (Atencio et al., 2013) e *S. Cuspicaudus* (Pardo-Carrasco et al., 2015), com resultados satisfatório para a motilidade em concentrações recomendadas variando entre 8 e 11%. De acordo com Perry et al. (2019), as amidas possuem utilidade como um crioprotetor intracelular por causa de seu baixo peso molecular e alta permeabilidade celular. E esta condição de baixo peso molecular e alta permeabilidade celular, provocam menos estresse osmótico aos espermatozoides de acordo com Pena et al. (2011). Todavia, para a espécie *C. macropomum*, Varela Jr. et al. (2012b) ressaltou, concentrações maiores que 11% não devem ser recomendadas, pois aumenta o efeito de toxidez, reduzindo a integridade do DNA celular.

A análise cumulativa dos estudos não encontrou influência significativa de estudos específicos na média geral para motilidade. Contudo, a MR mostrou existir uma tendência em influenciar positivamente a motilidade. O aperfeiçoamento de técnicas de estimativa e análise no decorrer dos anos, as quais foram deixando de ser visuais (subjetivas) e passaram a ser eletrônicas, como uso do sistema CASA, pode explicar esse resultado. Esse software (CASA) possui capacidade de estimar com precisão a porcentagem de espermatozoides móveis em uma determinada amostra instantaneamente, dentre muitos outros parâmetros cinéticos do

esperma, inclusive alguns que não podem ser aferidos de forma visual, em uma mesma amostra (Gallego e Asturiano, 2018).

Nossa MR sugere que maiores diluições tendem a ser benéficas para o aumento da taxa de motilidade. Segundo Viveiros (2011), as proporções utilizadas na diluição do sêmen podem influenciar na qualidade do sêmen criopreservado e podem variar de acordo com a espécie e a concentração espermática. As proporções mais comuns para algumas espécies nativas, estão na faixa de 1:4 a 1:9 (Viveiros e Godinho, 2009; Murgas et al., 2014). É interessante a observação de Martinez-Paramo et al. (2017), que sugerem esforços para a padronização da proporção de diluição como nas demais espécies, poderá vir a contribuir para a adoção da tecnologia em escala comercial. Este conceito é largamente adotado para bovinos em que as amostras seminais possuem concentração espermática para doses exatas por palhetas.

Houve indícios de viés de publicação, a qual pode ser refletida na MA, além da necessidade de adição de 34 estudos deixar o gráfico de funil simétrico. Podemos destacar que o uso apenas de estudos publicados e a não avaliação da literatura cinza (teses, dissertações, anais de congressos, boletins técnicos) como uma limitação desta RS-MA e que é capaz de justificar nossos resultados.

Os trabalhos incluídos nesta MA produziram resultados heterogêneos, confirmando que a resposta à criopreservação do sêmen de espécies neotropicais não é consistente e uniforme. Deste modo, para a obtenção de respostas consistentes quanto aos efeitos da criopreservação nos parâmetros de motilidade e tempo de motilidade em peixes é fundamental considerar os vários fatores e as suas interações. Os desafios para novos estudos estão no detalhamento da metodologia e protocolo utilizados, assim como na padronização no desenvolvimento de suas pesquisas, tornando os resultados mais facilmente comparáveis. A partir desta afirmação, a observação de Tiersch (2011) continua atual, quando elegeu a falta

de padronização em termos, protocolos e exibição dos resultados, quando vamos usar a literatura existe nas pesquisas com criopreservação de espécies aquática. Podemos acrescentar também a necessidade do cuidado com o uso de palavras-chave, que estejam alinhadas com o assunto tema do estudo, facilitando assim o acesso a este pelas buscas em bases de dados.

Concluimos com nossa RS e MA que o aumento da diluição favorece as taxas de motilidade do sêmen criopreservado, e que crioprotetores do tipo álcool e amida tendem a estar associados a melhores resultados para esta variável. Para tempo de motilidade, o uso de protocolos com glicose favoreceu os gêneros *Prochilodus*, *Piaractus* e *Colossoma*, quando comparados ao gênero *Brycon*. Entretanto, o uso de álcoois como crioprotetores para peixes dos gêneros descritos, pode causar diminuição no tempo de motilidade espermática especialmente os crioprotetores etilenoglicol e propilenoglicol.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- Adames, M. S., De Toledo, C. P. R., Neumann, G., Buzzi, A. H., Buratto, C. N., Piana, P. A., Bombardelli, R. A., 2015. 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*. **161**, 119–128.
- Atencio, V. G., Dorado, M. L., Montes, C. P., Prieto-Guevara, M., Espinosa-Araujo, J. Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. *Revista Colombiana Biotecnología*. **19** (2): 87–94(2017).
- Atencio, V. J., Espinosa, J. A., Martinez, J. G., Pardo-Carrasco, S. C. Insemination of bocachico fish (*Prochilodus magdalenae*) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **28** (4): 347–355 (2015).

- Atencio, V. J., Perez, E. J., Espinosa, J. A., Pardo-Carrasco, S. C. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Archivos de Medicina Veterinaria. **45**: 151–158 (2013).
- Berwanger, O., Suzumura, E. A., Buehler, A. M., Oliveira, J. B. Como avaliar criticamente revisões sistemáticas e metanálises. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. **19** (4): 475–80 (2007).
- Bobe J. & Labbe, C. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology. **165** (3):535–548 (2009).
- Bobe, J.; Labbé, C. Chilled storage of sperm and eggs. **In**: Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, P. (Eds), Methods in Reproductive Aquaculture – Marine and Freshwater. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 219-231 (2009).
- Borges, A. M., Araujo, K. O., Pivato, I., Navarro, R. D., 2020. Ultrastructure and sperm cryopreservation of the amazon catfish (*Leiarius marmoratus*) in captivity. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria e Zootecnia. **72** (1): 253–262.
- Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins, J.P.T., Rothstein, H.R. Introduction to Meta-Analysis. John Wiley and Sons, Ltd., The Atrium, Chichester, UK. (2009).
- Browne, R. K., Kaurova, S. A., Uteshev, V. K., Shishova, N. V., McGinnity, D., Figiel, C. R., Cosson, J. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. Theriogenology. **83** (1): 1–13 (2015).
- Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, C., Robles, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. Aquaculture. **432**: 389–401 (2014).
- Canozzi, M. E. A., Mederos, A., Manteca, X., Turner, S., McManus, C., Zago, D., Barcellos, J. O. J. A meta-analysis of cortisol concentration, vocalization, and average daily gain associated with castration in beef cattle. Research in Veterinary Science. **114**: 430–443 (2017).
- Canozzi, M. E. A., Mederos, A., Turner, S., Manteca, X., McManus, C., Menegassi, S. R. O., Barcellos, J. O. J. Dehorning and welfare indicators in beef cattle: a meta-analysis. Animal Production Science. **59** (5): 801–814(2019).
- Cardoso, M. F C. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos dimetilssulfóxido (CAS No. 67-68-5). Revista Virtual de Química. **3** (4) (2011). <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v3n4a09.pdf> (accessed 13 june 2019).

- Carolsfeld, J., Godinho, H. P., Zaniboni Filho, E., Harvey, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*. **63** (2): 472–489 (2013).
- Carneiro, P.C.F.; Azevedo, H.C.; Santos, J.P.; Maria A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryoletters*. **33** (3): 285–393 (2012).
- Castro, A. A.; Guidugli, F. Revisão sistemática: análise e apresentação dos resultados. *Elaboração e Apresentação de Comunicação Científica*. São Paulo, pp. 81-122 (2001).
- Cernicchiaro, N., Corbin, M., Quinn, M., Prouty, F., Branine, M., Renter, D. G. Meta-analysis of the effects of laidlomycin propionate, fed alone or in combination with chlortetracycline, compared with monensin sodium, fed alone or in combination with tylosin, on growth performance, health, and carcass outcomes in finishing steers in North America. *Journal of Animal Science*. **94** (4): 1662–1676 (2016).
- Coser, A. M.; Godinho, H.; Ribeiro, D., 1984. Cryogenic preservation of spermatozoa from *prochilodus-scrofa* and *salminus-maxillosus*. *Aquaculture*. **37** (4): 387–390 (1984).
- Cruz-Casallas, P. E., Pardo-Carrasco, S. C., Arias-Castellanos, J. A., Lombo-Castellanos, P. E., Lombo-Rodríguez, D. A., Pardo-Mariño, J. E. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. *Journal Of The World Aquaculture Society*. **35** (4): 529–535 (2004).
- Cruz-Casallas, P. E., Medina Robles, V. M., Velasco-Santamaria, Y. M. Evaluación de diferentes crio-protectores para la crioconservación de esper-matozoides de yamú *Brycon amazonicus*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **19** (2): 152–159 (2006).
- Da Costa, B. B., Marques, L. S., Lassen, P. G., Rodrigues, R. B., Streit, D. P. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Applied Ichthyology*. **35** (4): 987-993 (2019).
- Der Simonian, R., Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials* **7**: 177–188 (1986).
- Duval, S.; Tweedie, R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics*. **56** (2): 455–463 (2000).
- Egger, M., Smith, G.D., Altman, D.G. *Systematic Reviews in Health Care*, Second ed. MBI Publishing Group, London, UK (2001).

- Elliott, G. D.; Wang, S.; Fuller, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. **76** (1): 74–91 (2017).
- Figueroa, E.; Valdebenito, I.; Farias, J. G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*. **47** (6): 1691–1705 (2016).
- Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., Olivera-Angel, M. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **17** (1): 48–56 (2004).
- Galo, J. M., Streit-Junior, D. P., Oliveira, C. A., Povh, J. P., Fornari, D. C., Digmayer, M., Ribeiro, R. P. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*. **79** (3): 438–445 (2019).
- Galo, J., Streit-Junior, D., Sirol, R., Ribeiro, R., Digmayer, M., Andrade, V., Ebert, A. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Brazilian Journal of Biology*. **71** (3): 693–699 (2011).
- Gallego, V.; Asturiano, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and Development*. **30** (6): 820–832 (2018).
- Godinho, H. P. and A. T. M. Viveiros. Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. **In:** Tiersch, T.R. and Green, C. C. editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. pp. 875–884 (2011).
- Gonçalves, A.C.S., Nascimento, A. F., Costa A. C., Leal, M. C., Viveiros, A. T. M. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Animal Reproduction*. **10**(1):62–70 (2013).
- Hazel, J.R., Williams, E.E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*. **29** (3): 167–227 (1990).
- Higgins, J. P. T., Altman, D. G., Gotzsche, P. C., Juni, P., Moher, D., Oxman, A. D. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *British Medical Journal*. **343**: 9–20 (2011)
- Higgins J. P. T., Thompson S. G., Deeks J. J., Altman D. G. Measuring inconsistency in meta-analyses. *British Medical Journal*. **327**: 557–560 (2003).

- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Han, J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*. **6** (1): 12–18 (2017).
- Kopeika, E., Kopeika, J. 2008. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. **In:** Alavi, S. M. H., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. editors. *Fish spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford, pp. 347–396 (2008).
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R. Determination of semen quality of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism. *Aquaculture*. **163**: 163–181(1998).
- Lahnsteiner, F.; Mansour, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*. **307** (1): 130–140 (2010).
- Liu, Q., Li, J., Zhang, S., Ding, F., Xu, X., Xiao, Z., Xu, S. An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatozoa of Red Seabream, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials. *Journal of the World Aquaculture Society*. **37** (3): 289–297 (2006).
- Martínez, J., Atencio García, V., Pardo Carrasco, S. DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi, Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glu-cose. *Neotropical Ichthyology*. **10** (3): 577–586 (2012).
- Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Cabrita, E. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. **472**: 156–177 (2017).
- Mederos, A., Waddell, L., Sánchez, J., Kelton, D., Peregrine A.S., Menzies P., Van Leeuwen, J., Rajic, A. A. A systematic review-meta-analysis of primary research investigating the effect of selected alternative treatments on gastrointestinal nematodes in sheep under field conditions. *Preventive Veterinary Medicine*. **104** (1): 1–14 (2012).
- Melo-Maciel, M. A. P., Leite Castro, L. V., Leite, J. S., Oliveira, M. S., Monteiro, P. S. A., Nunes, J. F., Salmito-Vanderley, C. S. B. Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **67** (3): 945–949 (2015).
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *Journal of Clinical Epidemiology*. **62** (10): 1006–1012 (2009).

- Muchlisin, Z. A.; Azizah, M. N. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. *Cryobiology*, **58** (2): 166–169 (2009).
- Murgas, L.D.S Paulino, M. S., Palhares, P. C., Miliorini, A. B., Alves, E., Felizardo, V. O., 2017. Ultrastructural and morphometric analysis of gametes in neotropical teleost fishes. *Journal of Fisheries Science*. **11**: 6–61 (2017).
- Murgas, L. D. S.; Felizardo, V. O.; Andrade, E. S.; Ferreira, M. R.; Paula, D. A. J.; Carvalho, A. F. S. Cryopreservation of Sperm in Brazilian Migratory Freshwater Fish, **In**: Yamashiro, H. editors. *Recent Advances in Cryopreservation*. InTech, pp. 59–71 (2014).
- Nascimento, R. V., Leite-Castro, L. V., Montenegro, A. R., Oliveira-Araújo, M. S., Lopes, J. T., Almeida-Monteiro, P. S., Salmito-Vanderley, C. S. B. Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* sêmen. *Acta Scientiae Veterinariae*, **45** (1480): 1-9 (2017).
- Navarro, O., Velasco-Santamaría, Y., Y Cruz-Casallas, P. Evaluación de cinco crioprotectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **17**: 53–59 (2004).
- Nunes, L. T., Oliveira-Araújo, M. S., Lopes, J. T., Almeida-Monteiro, P. S., Nascimento, R. V., Salmito-Vanderley, C. S. B. Fertilizing Capacity of the Cryopreserved Sperm of *Prochilodus brevis*. *Acta Scientiae Veterinarie*. **47**(1665): 1-6 (2019).
- Nynca, J.; Judycka, S.; Liszewska, E.; Dobosz, S.; Ciereszko, A. Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*. **477**(1): 23–27 (2017).
- Pardo-Carrasco, S., Villalva, J. S., Gaviria, L. R., Araujo, J. E., Atencio-Garcia, V. Cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish (*Sorubim cuspicaudus*) semen using dimethylacetamide. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. **100** (2): 122–131 (2015).
- Peña, F. J., Macías García, B., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols. *Theriogenology*. **76** (7):1177–1186 (2011).
- Pereira, J. R., Pereira, F. A., Perry, C. T., Pires, D. M., Muelbert, J. R. E., Garcia, J. R. E., Varela Jr., A. S. Dimethylsulfoxide, methanol and methylglycol in the seminal cryopreservation of Suruvi, *Steindachneridion scriptum*. *Animal Reproduction Science*. **200** (1): 7–13 (2019).

- Perry, C. T., Corcini, C. D., Ancuti, A. N., Otte, M. V., Soares, S. L., Garcia, J. R. E., Varela Jr., A. S. Amides as cryoprotectants for the freezing of *Brycon orbignyanus* sperm. *Aquaculture*. **508** (1): 90–97 (2019).
- Ramirez-Merlano, J. A., Velasco-Santamaría, Y. M., Medina-Robles, V. M., Cruz-Casallas, P. E. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachyomus* (Cuvier 1818). *Aquaculture Research*. **42** (6): 738–745 (2011).
- Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*. **89** (1): 12–47 (2016).
- Restrepo-Betancur, G.; Montoya Páez, J. D.; Arboleda Chacón, L. Evaluación de Dos Crioprotectores y Tres Curvas de Congelación Programable en la Criopreservación de Semen de *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. **28** (3): 597-605 (2017).
- Salmito-Vanderley, C. S. B., Pinheiro, J. P. S., Almeida, P. S., Lopes, J. T., Leite L.V. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. *Acta Veterinária Brasileira*. **8** (2): 343–350 (2014).
- Soares, F. A. C., Streit, D. P. Jr., Ebert, A. R., Coldebella, I. J., & Oberst, E. R. Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera. *Revista Brasileira De Ciência Veterinária*. **17** (3): 129–133 (2010).
- Streit, D. P. Jr., Oliveira, A. C., Ribeiro, R. P., Sirol, R. N., Moraes, G. V., Galo, J. M., Digmayer, M. Motilidade, vigor e patologia seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim Instituto de Pesca*. **35**: 159–167 (2009).
- Streit, D. P. Jr., Benites, C., Moraes, G. V. de, Ribeiro, R. P., Sakaguti, E. S., Caldieri, R. F. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*. **7** (3): 289–297 (2006).
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*. **31** (3): 231–243 (2000).
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **9**: 112–124 (2008).
- Varela Junior, A. S., Goularte, K. L., Alves, J. P., Pereira, F. A., Silva, E. F., Cardoso, T. F., Corcini, C. D. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Animal Reproduction Science*. **157**: 71–77 (2015).

- Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Gheller, S. M. M., Jardim, R. D., Lucia, T., Streit, D. P., Figueiredo, M. R. C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*. **78** (2): 244–251 (2012).
- Varela Jr, A. S., Corcini, C. D., Streit Jr, D. P., Rizzoto, G, Jardim, R. D., Lucia Jr, T., Figueiredo, M. R. C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. *Atlântica*. **34** (2): 129–137 (2012).
- Vasconcelos, A. C. N., Felizardo, V. O., Carvalho, A. F. S., Roberto Freitas Garcia, R. R. F., Ramos, S. E., Murgas, L. D. S. Cryopreservation of *Prochilodus lineatus* semen: effect of cryoprotectants combination. *Boletim Instituto de Pesca*. **41**: 817–824 (2015).
- Viveiros, A. T.; Godinho, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*. **35** (1): 137–50 (2009).
- Viveiros, A. T. M., Motta, N. C., Isaú, Z. A., Almeida, I. L. G., Leal, M. C. Ions and osmolality on post-thaw sperm motility activation of the endangered *Brycon insignis* (Characiformes). *Journal of Applied Ichthyology*. **35** (3): 739–746 (2019).
- Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Leal, M. C., Gonçalves, A. C., Orfão, L. H., Cosson, J. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*. **41** (1): 193–201 (2015).
- Viveiros, A. T. M., Amaral, T. B., Orfão, L. H., Isaú, Z. A., Caneppele, D., Leal, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research*. **42** (6): 858–865 (2011).
- Viveiros, A. T. M. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. **In:** Tiersch, T. R., Green, C. C. editors, *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd. ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, pp. 387–397 (2011).
- Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Orfão, L. H., Isaú, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. **74** (4): 551–556 (2010).
- Zhang, X., Ma, J., Linmiao, L., Jiang, .H, Jinping, C. Effects of Different Cytoprotectants Combination on Sperm Survival, Fertility and Embryo Development in Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*;). *Animal and Veterinary Sciences*. **6** (4): 51–57 (2018).

Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S. L., Rawson, D. M. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, Rockville. **50** (3): 285--293 (2005).

Tabela 1: Sequências de termos de pesquisa de população, resultado e intervenção usados para a pesquisa final na revisão sistemática.

Acrônimo	Ordem de pesquisa
População	Fish: refere-se a superclasse peixes, especificamente as espécies neotropicais de água doce pertencentes a Superordem Ostariophysi.
Intervenção	Chilling, Cryopreservation, Cooling, Freezing, Frost, Frozen, Vitrification: refere-se ao ato de congelar, estecificamente criopreservação, caracterizada como a preservação da viabilidade do material biológico em temperaturas extremamente baixas, abaixo de -80°C ou de -140°C (Baust et al., 2009).
Resultado	Sperm, semen: refere-se á secreção produzida por glândulas reprodutivas masculinas, contendo espermatozoides.

Tabela 2. Um resumo descritivo de cada estudo relevante incluído na meta-análise e meta-regressão sobre motilidade e tempo de motilidade de sêmen criopreservado de peixes.

Publicação	População (espécie e número amostral)	Crioprotetor interno
Navarro et al. (2004) ¹	<i>Piaractus brachypomus</i> (15)	Me ₂ SO, MeOH, ETG, GLI, PPG
Fresneda et al. (2004) ¹	<i>Piaractus brachypomus</i> (14)	Me ₂ SO, MeOH
Cruz-Casallas et al. (2004) ¹	<i>Brycon siebenthalae</i> (10)	Me ₂ SO
Cruz-Casallas et al. (2006) ¹	<i>Brycon amazonicus</i> (10)	Me ₂ SO, MeOH, ETG, PPG
Streit et al. (2006) ²	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (12)	Me ₂ SO
Streit et al. (2009) ²	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (11)	Me ₂ SO
Viveiros et al. (2010) ²	<i>Prochilodus lineatus</i> (8)	METH
Ramirez-Merlano et al. (2011) ¹	<i>Piaractus brachypomus</i> (23)	Me ₂ SO, MeOH, ETG
Galo et al. (2011) ²	<i>Brycon orbignyanus</i> (10)	Me ₂ SO
Viveiros et al. (2011) ²	<i>Brycon insignis</i> (18)	Me ₂ SO, METH
Varela Jr et al. (2012) ²	<i>Colossoma macropomum</i> (8)	Me ₂ SO
Martinez et al. (2012) ¹	<i>Prochilodus magdalenae</i> (6)	Me ₂ SO
Varela Jr et al. (2012 b) ²	<i>Colossoma macropomum</i> (40)	Me ₂ SO, GLI, DMA, DMF, MF

Atencio et al. (2013) ¹	<i>Prochilodus magdalenae</i> (12)	DMA
Atencio et al. (2015) ¹	<i>Prochilodus magdalenae</i> (7)	Me ₂ SO
Vasconcelos et al. (2015) ²	<i>Prochilodus lineatus</i> (19)	Me ₂ SO, MeOH
Pardo-Carrasco et al. (2015) ¹	<i>Sorubim cuspicaudus</i> (16)	DMA, DMF, MF
Melo-Maciel et al. (2015) ²	<i>Colossoma macropomum</i> (30)	Me ₂ SO
Varela Jr et al. (2015) ²	<i>Colossoma macropomum</i> (16)	Me ₂ SO
Restrepo-Betancur et al. (2017) ¹	<i>Brycon henny</i> (80)	Me ₂ SO, ETG
Nascimento et al. (2017) ²	<i>Prochilodus brevis</i> (15)	Me ₂ SO
Atencio et al. (2017) ¹	<i>Brycon moorei</i> (9)	Me ₂ SO
da Costa et al. (2019) ²	<i>Rhamdia quelen</i> (5)	MeOH
Galo et al. (2019) ²	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (6)	Me ₂ SO
Nunes et al. (2019) ²	<i>Prochilodus brevis</i> (20)	Me ₂ SO, METH

^{1,2} País de origem da publicação: ¹Colômbia, ²Brasil.

DMA = dimetilacetamida; DMF = dimetilformamida; ETG= etilenoglicol, GLI= glicerol; METH = metilglicol; MeOH = metanol; Me₂SO= Dimetilsulfóxido; MF= metilformamida; PPG= propilenoglicol.

Tabela 3. Características descritivas das publicações de relatórios dos estudos incluídos na revisão sistemática-meta-análise.

Variável	Categoria	Número de publicações (estudos)
Tipo de publicação	Revisado por pares	25 (26)
Data da publicação	2000 – 2010	7 (8)
	2011 – 2019	18 (18)
Família	<i>Bryconidae</i>	6 (6)
	<i>Prochilodontidae</i>	7 (7)
	<i>Serrasalminae</i>	10 (11)
	<i>Pimelodidae</i>	2 (2)
Gênero	<i>Brycon</i>	6 (6)
	<i>Prochilodus</i>	7 (7)
	<i>Piaractus</i>	6 (7)
	<i>Colossoma</i>	4 (4)
	<i>Rhamdia</i>	1 (1)
	<i>Sorubim</i>	1 (1)
Crioprotetor interno	Base (Me ₂ SO)	21 (22)
	Álcool (glicerol, etilenoglicol, metanol, metilglicol e propilenoglicol)	12 (11)
	Amidas (DMF, DMA, MF)	3 (3)
Tamanho de amostra	≤ 20	21 (22)
	21-80	4 (4)
País	Brasil	14 (14)
	Colômbia	11 (12)

Tabela 4. Validade interna dos estudos incluídos na revisão sistemática usando a ferramenta Cochrane Collaboration para avaliar o risco de viés para motilidade de sêmen criopreservado de peixes.

Autor e ano	Geração de sequência	Ocultação de alocação	Cegamento dos envolvidos	Cegamento de avaliação dos desfechos	Desfecho Incompletos	Relato de desfecho seletivo
Navarro et al. (2004)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Fresneda et al. (2004)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Cruz-Casallas et al. (2004)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Cruz-Casallas et al. (2006)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Streit et al. (2006)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Streit et al. (2009)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Viveiros et al. (2010)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Incerto
Ramirez-Merlano et al. (2011)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Incerto
Galo et al. (2011)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Viveiros et al. (2011)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Varela Jr et al. (2012)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Martinez et al. (2012)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Incerto
Varela Jr et al. (2012 b)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Atencio et al. (2013)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Incerto

Atencio et al. (2015)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Vasconcelos et al. (2015)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Pardo-Carrasco et al. (2015)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Melo-Maciel et al. (2015)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Incerto
Varela Jr et al. (2015)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Incerto
Restrepo-Betancur et al. (2017)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Nascimento et al. (2017)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Atencio et al.; (2017)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
da Costa et al. (2019)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Galo et al. (2019)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Nunes et al., (2019)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa

Tabela 5. Resumo da avaliação metodológica e / ou notificação das publicações que relatam os estudos incluindo nesta revisão.

Variável	Avaliação	Número de Publicações (estudos)	
		Motilidade	Tempo de Motilidade
O tamanho amostral foi justificado?	Sim	0 (0)	0 (0)
	Não	25 (26)	10 (11)
Como as amostras foram distribuídas nos tratamentos?	Aleatorizados	0 (0)	0 (0)
	Aleatorização citada	10 (10)	2(2)
	Sistematicamente	15 (16)	8 (9)
	Conveniência ou não reportado	0 (0)	0 (0)
O protocolo de intervenção foi descrito em detalhes suficientes para ser replicado?	Sim	3 (3)	0 (0)
	Não	0 (0)	0 (0)
	Citação de referência	22 (23)	10 (11)
O autor relatou cegueira ao avaliar os resultados?	Sim	0 (0)	0 (0)
	Não	25 (26)	10 (11)
Os fatores de confusão foram identificados, controlados ou testados?	Sim	0 (0)	0 (0)
	Não	25 (26)	10 (11)
	Não aplicável	0 (0)	0 (0)
A análise estatística foi descrita adequadamente para que possa ser reproduzida?	Sim	25 (26)	10 (11)
	Não	0 (0)	0(0)
	Referências citadas	0 (0)	0(0)
	Não existe análise estatística.	0 (0)	0(0)

Tabela 6. Análises de subgrupo realizadas na meta-análise do indicador motilidade de sêmen criopreservado de peixes.

Contraste	N^a de ensaios	DM (%); Valor de P (IC 95%)	I² (%) (Valor de P)
Controle vs. crioprotetor álcool	45	7,35; P= 0,00 (6,39 8,31)	93,5 (0,00)
Controle vs. crioprotetor amidas	18	4,27; P= 0,00 (3,41 5,14)	94,2 (0,00)
Controle vs. crioprotetor Me ₂ SO	53	7,60; P= 0,00 (6,69 8,52)	92,3 (0,00)
Controle vs. inclusão de crioprotetor em níveis baixos	28	6,11; P= 0,00 (5,29 6,94)	86,1 (0,00)
Controle vs. inclusão de crioprotetor em níveis médios	72	5,50; P= 0,00 (4,91 6,08)	92,9 (0,00)
Controle vs. inclusão de crioprotetor em níveis altos	16	23,93; P= 0,00 (17,63 30,23)	95,7 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis baixos de Me ₂ SO	10	8,51; P= 0,00 (6,04 10,98)	87,5 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis baixos de metanol	3	5,49; P= 0,00 (3,02 7,96)	71,9 (0,02)
Controle vs. inclusão em níveis baixos de glicerol	2	12,55; P= 0,03 (0,959 24,14)	92,5 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis baixos de etilenoglicol	4	6,68; P= 0,00 (4,46 8,91)	71,0 (0,01)
Controle vs. inclusão em níveis baixos de propilenoglicol	3	5,91; P= 0,00 (4,56 7,26)	0 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis médios de Me ₂ SO	34	5,79; P= 0,00 (4,93 6,66)	91,1 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis médios de metanol	10	5,88; P= 0,00 (3,94 7,81)	93,5 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis médios de etilenoglicol	4	15,05; P= 0,00 (8,22 21,87)	84,7 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis médios de propilenoglicol	4	9,43; P= 0,00 (5,03 13,82)	84,1 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis médios de metilglicol	7	1,18; P= 0,00 (1,13 2,50)	76,8 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis médios de DMF	8	7,72; P= 0,00 (5,03 10,41)	96,0 (0,00)

Controle vs. inclusão em níveis altos de Me ₂ SO	9	26,01; P= 0,00 (18,73 33,30)	86,3 (0,00)
Controle vs. inclusão em níveis altos de metanol	2	24,25; P= 0,00 (13,79 34,71)	61,8 (0,10)
Controle vs. inclusão em níveis altos de etilenoglicol	3	17,47; P= 0,02 (2,09 32,85)	95,7 (0,00)

n^a: número de estudos; I²: porcentagem da variação total nos estudos devido à heterogeneidade e não ao acaso.

DM: diferença média. DM positivo significa que o primeiro elemento do contraste é maior que o segundo, enquanto DM negativo significa que o segundo elemento de contraste é maior do que o primeiro elemento.

Tabela 7. Resultados da meta-regressão univariada mostrando covariáveis significativas ($P < 0,05$) investigadas como potenciais fontes de heterogeneidade do estudo. Os resultados explicados para cada uma das covariáveis incluídas na meta-análise são apresentados para percentagem de motilidade de sêmen criopreservado de peixes.

Nº de estudos ^A (Ensaio) ^B	Covariável	Estimado ^C	IC95% ^D	Valor de P	I ² (%)	Adj-R ² (%)
Motilidade 26 (116)	Modelo	9,43	7,63; 11,23	-	93,20	NA
	Ano de publicação	-0,37	-0,75; 0,016	0,06	93,24	6,84
	Tamanho de amostra	11,10	-0,14; -0,04	0,00	93,11	18,82
	Percentual de inclusão	-1,15	-0,69; 1,63	-	93,26	27,54
	Diluição	-0,93	-0,29; 0,84	0,00	92,28	29,68
	Tipo de crioprotetor	-	-	-	93,14	1,75
	Base	Referente	-	-	-	-
	Álcool	0,39	-3,54; 4,32	0,84	-	-
	Amida	-2,53	-7,80; 2,73	0,34	-	-
	Nível de inclusão	-	-	-	92,64	43,76
	Baixo	Referente	-	-	-	-
	Alto	14,64	9,29; 19,98	0,00	-	-

I², variação residual entre os estudos; Adj-R², percentagem da variação residual; ^ANúmero de estudos incluídos na meta-regressão. ^BNúmero de ensaios incluídos na meta-regressão. ^CDiferença média padrão do tamanho do efeito. ^DEstes valores representam intervalos de confiança de 95% (IC) para o tamanho do efeito.

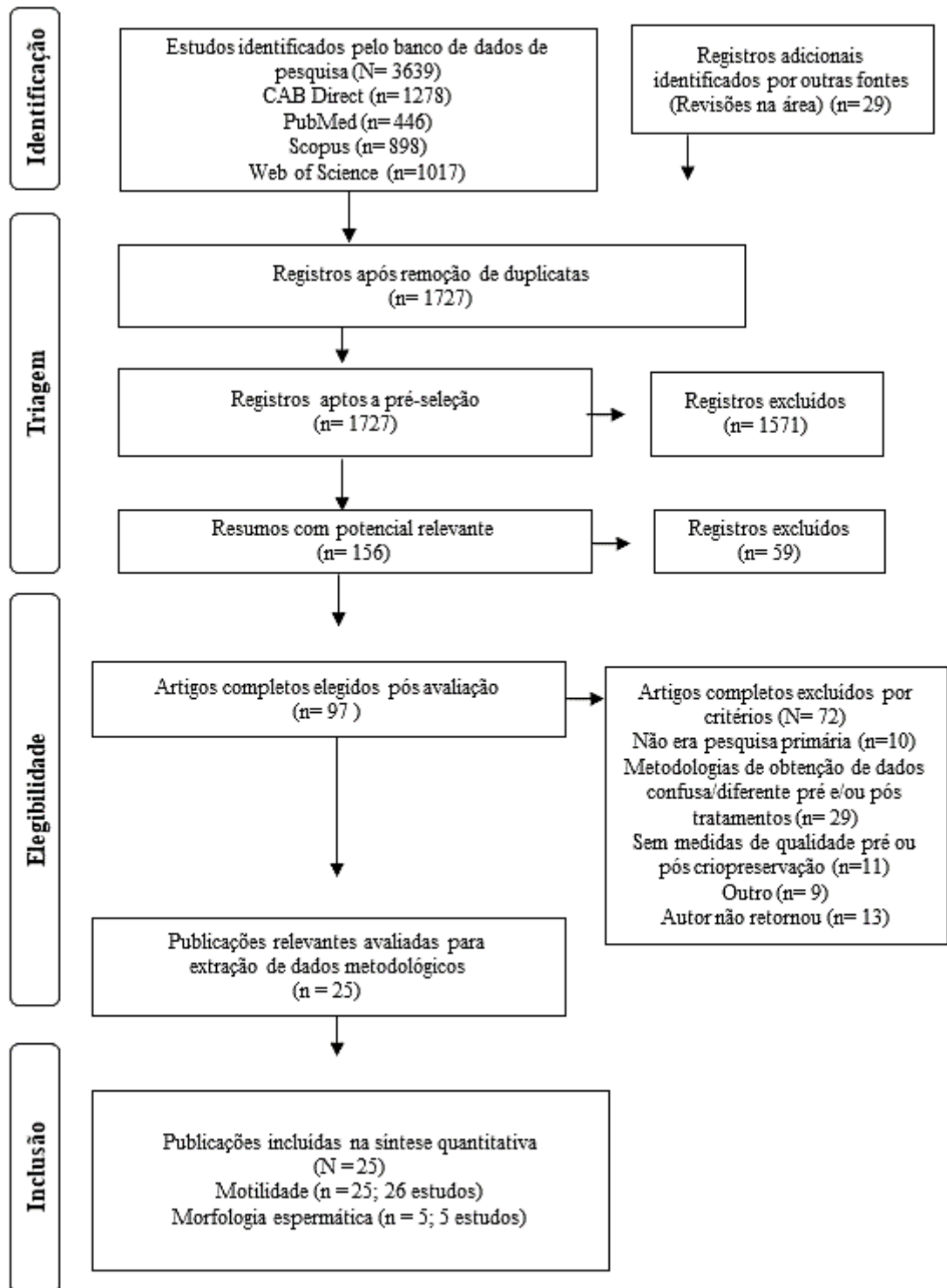


Figura. 1. Fluxograma descrevendo o processo de triagem para a revisão dos efeitos da criopreservação nos indicadores de qualidade do sêmen de peixes neotropicais de água doce. MA: meta-análise. Adaptado das diretrizes do PRISMA (Moher et al. 2009).

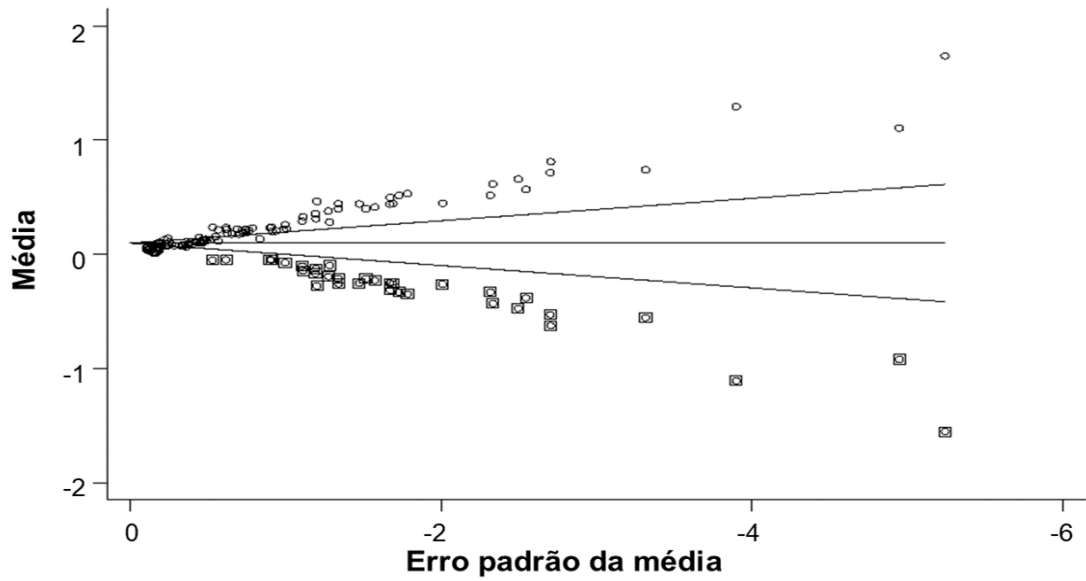


Figura. 2. Gráfico de funil obtido com o “trim and fill” de Duval e Tweedie, modelo de efeito aleatório linear de preenchimento medindo a diferença média na motilidade como resposta. Os círculos representam a estimativa pontual original para cada estudo (DM) e as círculos envoltos em um quadrado representam os estudos que o programa imputou ($n = 34$) para criar um gráfico simétrico.

Capítulo III ¹
Anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes
neotropicais sul-americanos: uma meta-análise

¹Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Theriogenology*.

Anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos: uma meta-análise

Paula Graziela Lassen^{a*}

^aAquam Research Group, Department and Program of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author email: p.g.lassen@gmail.com

Resumo

Uma revisão sistemática e meta-análise (MA) foram realizadas para resumir as evidências científicas dos efeitos da criopreservação do esperma de espécies sul americanas de peixes de água doce nos indicadores de morfologia espermática caracterizados pela percentagem de células normais e com anormalidades primárias e secundárias. A estratégia de busca foi aplicada em quatro bases de dados eletrônicas e especialistas foram contatados eletronicamente. Os principais critérios de inclusão envolveram estudos realizados com peixes neotropicais cujos gametas masculinos foram submetidos ao processo de criopreservação. Meta-análise para efeitos aleatórios foi realizada para cada indicador separadamente com a média dos grupos controle e grupos tratados. Um total de cinco publicações relatando cinco estudos e 15 ensaios foram incluídos na MA envolvendo 3 peixes de espécies distintas. Foi observada heterogeneidade entre os estudos em todas as variáveis. De maneira geral, a percentagem de células normais não apresentou alterações significativas após a criopreservação. As anormalidades morfológicas primária aumentaram, significativamente, a um nível de 1,91% (IC 95%: - 3.727, - 0.097; $P=0,021$), após a criopreservação, quando comparadas ao sêmen fresco. A percentagem de anormalidades secundárias não mostrou alteração significativa ($P \geq 0,05$) entre sêmen fresco e criopreservado. Nossos resultados sugerem que a criopreservação aumenta significativamente a percentagem de anormalidades primárias pós criopreservação, não causando influência significativa na alteração de anormalidades secundárias.

Palavras-chave: anormalidades espermáticas, criopreservação, peixes neotropicais.

1 Introdução

A criopreservação de gametas é considerada uma importante ferramenta para a produção de juvenis em laboratórios [1], e dentre as biotécnicas reprodutivas, a de armazenamento de sêmen foi observada a mais de dez anos por Mazur et al. [2] como regularmente utilizadas. A criopreservação envolve a adição de solução crioprotetora, congelamento e descongelamento de amostras de sêmen. Porém, todos estes processos podem resultar em danos para as células espermáticas, diminuindo o sucesso da fertilização [3]. Nos últimos anos inúmeras técnicas tem sido incorporadas no processo de criopreservação de peixes como desenvolvimento de meios diluentes como a água de coco em pó [4, 5] e frutose [6], bem como o enriquecimento do meio diluente com antioxidantes [3] e vitaminas [7] e o congelamento por vitrificação [8], resultando em melhor eficiência do processo.

O sucesso da criopreservação depende da redução dos danos causados às células espermáticas durante o todo este processo [9]. Durante a criopreservação podem ocorrer danos de diferentes naturezas, que implicam no comprometimento da viabilidade das células reprodutivas [10]. Esses danos ocorrem devido à formação de gelo intracelular, efeito soluções, toxicidade do crioprotetor, bem como estresse oxidativo [3], levando a fatores morfológicos, bioquímicos e alterações fisiológicas que podem comprometer a qualidade espermática [10]. A desidratação e reidratação que ocorre durante o congelamento e reaquecimento pode alterar as funções dos canais iônicos ou a permeabilidade da membrana sensibilizando a célula [11]. Exposição de espermatozoides a condições osmóticas extremas leva a mudanças na morfologia e capacidade de movimento [12]. A baixa osmolaridade induz o inchaço da cabeça do espermatozoide, levando à ruptura da membrana plasmática [13], que pode causar o enrolamento do flagelo [14] afetando a capacidade de fertilização.

A análise da morfologia espermática é frequentemente utilizada em mamíferos como indicador da qualidade espermática, por seu baixo custo e facilidade de realização. Deve ser ressaltado que a qualidade espermática é fundamental no sucesso da fertilização, sendo de extrema importância sua avaliação durante a reprodução, como citado por Galo et al. [15] em *Brycon orbygnianus* e Sanches et al. [16] em *Rhamdia quelen*. Além disso, devido a variabilidade das pesquisas utilizando diferentes tipos de crioprotetor, a integração de resultados de muitos estudos, usando revisão sistemática (RS) e meta-análise (MA) pode fornecer uma estimativa igualmente imparcial do efeito de tratamento, com um aumento na precisão [17, 18]. Lean et al.

[19] relataram que uma MA rigorosamente conduzida poderia fornecer novas ideias sobre a reprodução animal.

Neste estudo buscamos testar a hipótese de que a criopreservação afeta a incidência de anormalidades morfológicas no sêmen de peixes neotropicais sul-americanos. Com isso, o objetivo deste estudo foi identificar, avaliar criticamente e sintetizar os estudos disponíveis na literatura sobre os danos causados na estrutura morfológica dos espermatozoides após a criopreservação de espécies neotropicais sul americanas usando uma abordagem SR-MA.

2 Material e métodos

2.1. Pesquisa e fonte de dados

As buscas eletrônicas foram realizadas nas bases de dados CAB Direct (Springer Nature, 1973-2019), Pub Med (MEDLINE, 1940-2019), Scopus (Elsevier, 1960-2019) e ISI Web of Science (Thomson Reuters, 1900-2019), com a opção de vocabulário controlado, utilizada quando disponível (Figura 1). A busca foi realizada em julho de 2018 e atualizada em agosto de 2019. Foram realizadas buscas adicionais, utilizando artigos de revisão já publicados.

A pergunta da RS foi definida com base nos termos da estratégia PICO: população, intervenção, comparador e resultado. A população (P) estudada foi espécies neotropicais de peixes de água doce; a intervenção (I), uso da criopreservação em amostras de sêmen dessas espécies; e os resultados (O) de interesse foram àqueles de avaliação de células normais e anormais (patologias primárias e secundárias). Os grupos de comparação (C) considerados foram crioprotetor interno utilizado nas soluções, em diferentes espécies submetidas ao mesmo procedimento, antes da intervenção e após criopreservação (Tabela 1). Neste artigo serão apresentados somente resultados relacionados a morfologia dos espermatozoides.

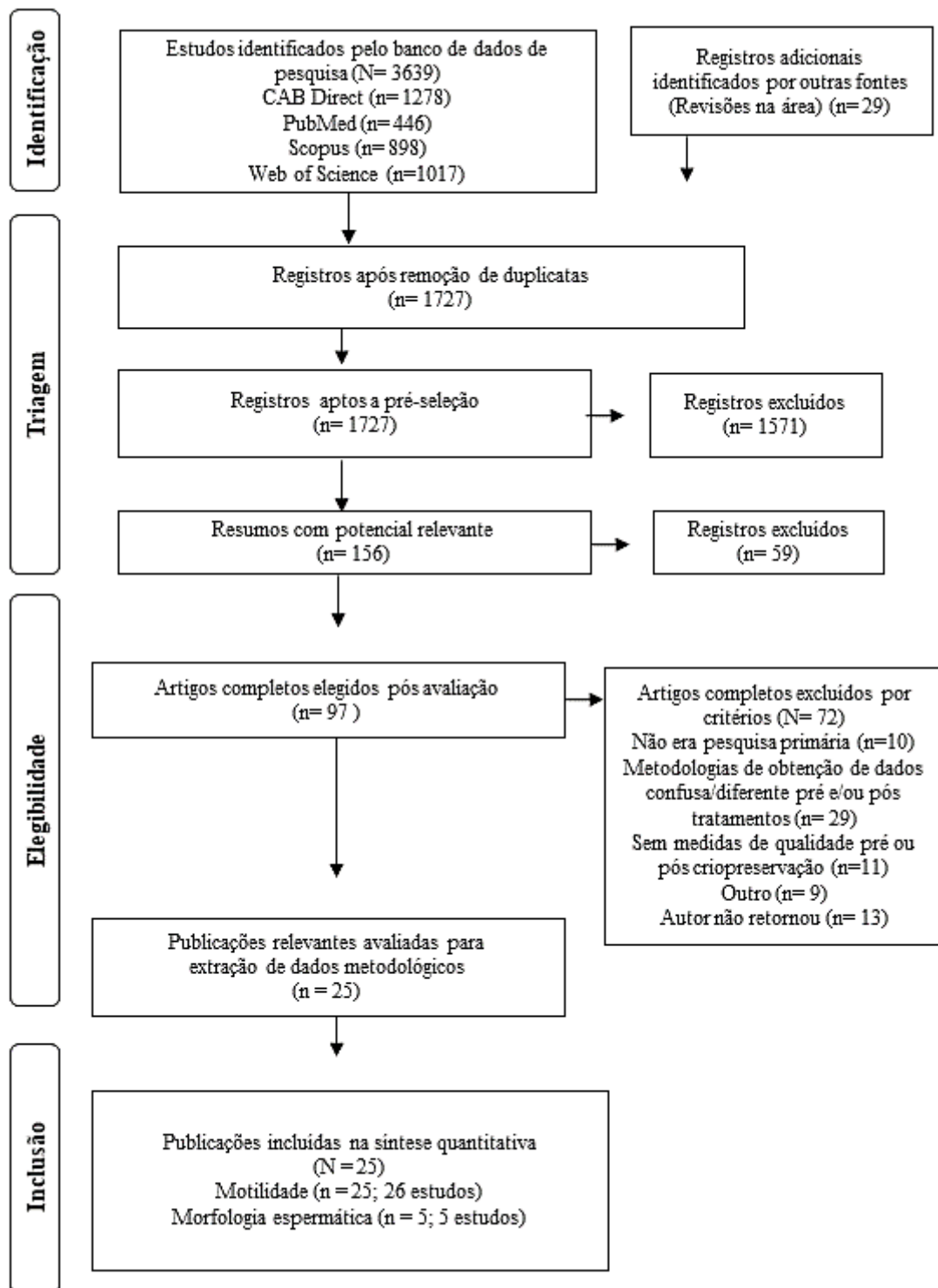


Fig. 1. Fluxograma descrevendo o processo de triagem para a revisão dos efeitos da criopreservação no indicador de anormalidade dos espermatozoides de peixes neotropicais sul-americanos de água doce. MA: meta-análise. Adaptado das diretrizes do PRISMA [20].

Uma lista de termos e algoritmos foi sumarizada com base na população, intervenção e resultados. As palavras-chave utilizadas na estratégia de busca na literatura foram: (fish*) AND (cryopreserv* OR criopreserv* OR freez* OR Cool* OR frost* OR froz* OR Chill* OR vitrific*) AND (sperm* OR semen*) (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de termos de pesquisa de população, resultado e intervenção usados para a pesquisa final na revisão sistemática.

Acrônimo	Ordem de pesquisa
População	Fish: refere-se a superclasse peixes, especificamente as espécies neotropicais de água doce pertencentes a Superordem Ostariophysi.
Intervenção	Chilling, Cryopreservation, Cooling, Freezing, Frost, Frozen, Vitrification: refere-se ao ato de congelar, estecificamente criopreservação, caracterizada como a preservação da viabilidade do material biológico em temperaturas extremamente baixas, abaixo de -80°C ou de -140°C (Baust et al., 2009).
Resultado	Sperm, semen: refere-se á secreção produzida por glândulas reprodutivas masculinas, contendo espermatozoides.

Os resultados da pesquisa foram exportados para um gerenciador bibliográfico (Mendeley, Elsevier) e citações duplicadas foram removidas. Nenhuma restrição de ano de publicação e de idioma foi aplicada neste momento.

2.2. Seleção dos estudos

Os estudos foram incluídos ou excluídos na revisão sistemática (RS) com base em formulário padronizado, adaptado de artigos já publicados [21,22]. Antes, uma triagem inicial das citações foi conduzida pelo primeiro autor, buscando eliminar estudos que não utilizaram peixes neotropicais como objeto de pesquisa.

Quatro revisores previamente treinados realizaram uma segunda etapa de triagem de relevância, com o uso de 30 resumos, o que serviu para auditar o processo de revisão. Uma última etapa foi conduzida de forma independente pelo primeiro e terceiro autor, avaliando o título, o resumo e as palavras-chave utilizando as perguntas:

- a) Este é um estudo primário de intervenção experimental?
- b) É realizado com peixes neotropicais?
- c) É avaliado pelo menos uma das seguintes intervenções: criopreservação ou uso similar de conservação de esperma de peixe?

Os estudos foram excluídos se ambos os revisores concordassem que o artigo não cumpria um ou mais desses critérios. Na existência de conflitos, os mesmos foram resolvidos por consenso entre os dois revisores. Caso não solucionado, a citação foi enviada para um terceiro revisor.

2.3. Extração e manipulação de dados

O formulário de extração de dados (ED) foi adaptado de estudos anteriores e foi realizada pelo primeiro autor. Se as publicações relataram mais de um estudo, os dados de cada estudo foram coletados separadamente. Antes da avaliação do risco de viés e da ED, a relevância de trabalhos selecionados através de triagem inicial foi confirmada com o uso do artigo completo com base no idioma (inglês, espanhol ou português); grupo de controle apropriado ou uso de amostras antes e depois intervenção; informações detalhadas para conduzir a ED quantitativos para realizar a MA. Nesta fase, a pesquisa foi restrita a publicações nesses idiomas, que os integrantes da equipe de pesquisa eram fluentes. Os detalhes do estudo incluíram população, intervenção, medidas de resultado, resultados e informações do manuscrito, como nome, autor (es), ano de publicação e idioma original. As características populacionais foram espécie, local de realização (fazenda comercial ou de pesquisa), idade média, método de indução hormonal (extrato de carpa pituitária ou outro) e operador (produtor ou pesquisador). Os dados obtidos para os grupos controle e tratado, para cada crioprotetor ou solução utilizada, foram nome do crioprotetor, concentração crioprotetora ou nível de inclusão (%), nome da solução, concentração de solução, técnica (vitrificação ou congelamento lento). Foram considerados grupo controle e tratado, sêmen fresco e criopreservado respectivamente.

Para cada resultado, buscamos reunir as seguintes informações: média, desvio padrão (s.d.) ou qualquer medida disponível de dispersão, unidade de medida, valor de p e número de animais no controle e grupos de tratamento. Todos os resultados para células normais e anormalidades foram coletados em percentagem, consideradas classificações de anormalidades seguindo metodologia descrita por Bloom [23], Bart & Oko [24] onde os danos celulares classificados como primários são: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, peça intermediária degenerada, cauda fraturada, cauda curta e cauda fortemente enrolada; e secundários: cabeça e cauda isolada, causa dobrada e gota citoplasmática proximal e distal

Os desfechos foram extraídos como medidas contínuas com a média para cada grupo (controle e tratado) e desvio padrão ou outra medida de dispersão. Caso isso não estivesse disponível, foram coletadas medidas de associação com erro padrão ou intervalo de confiança a 95%. Foram coletados o número de animais em cada estudo, se utilizados pool ou amostras individuais para obtenção de alíquotas, número total de amostras, o número de replicadas utilizadas em cada tratamento e metodologia para avaliação (subjetiva ou digital).

Resultados mencionados para os grupos controle e tratado com erro padrão da média ($SEMP$), foi utilizada a seguinte fórmula na transformação para desvio padrão [21,22]:

$$Sp = SEMp \times \sqrt{np}$$

onde Sp é o desvio padrão calculado e np é o número de amostras utilizadas nos grupos de tratado e controle.

Quando os resultados foram apresentados como gráficos, o autor correspondente foi contatado por correio eletrônico e solicitado a fornecer as estatísticas resumidas. Se a informação não era brindada, o artigo era excluído.

2.4. Avaliação do risco de viés

A avaliação do risco viés foi testada em quatro estudos pré-selecionados para testes de extração de dados. O risco de viés foi avaliado com a aplicação da ferramenta da *Cochrane Collaboration* para avaliar o risco de viés em ensaios randomizados [25], modificado para incluir, também, uma avaliação do relato de randomização (além da geração de sequência aleatória). Todos os desfechos foram avaliados manualmente pelo primeiro autor.

2.5. Meta-análise

O pacote estatístico Stata (StataCorp., College Station, TX, EUA) foi utilizado para analisar cada resultado por diferença de médias entre os grupos controle e tratado com intervalo de confiança a 95% (IC 95%). Dados analisados para anormalidades foram computados em percentagem. O efeito aleatório de meta-análise e meta-regressão foram realizadas a partir da prévia suposição da existência de heterogeneidade entre os estudos [26].

Análise de subgrupos. As análises de subgrupos foram realizadas com conjuntos de dados que consistiam em, pelo menos, dois estudos individuais que investigassem

tratamentos semelhantes avaliando o mesmo resultado. Os resultados da MA foram apresentados em diferença média combinada (DM) e IC 95%. O “Q” de Cochran (teste qui-quadrado para heterogeneidade) e “I²” (porcentagem da variação total entre estudos devidos à heterogeneidade e não ao acaso) foram obtidos com base nos subgrupos tipo de crioprotetor (Base ou álcool) e crioprotetor utilizado: dimetilsulfóxido (ME₂SO) ou Metanol. As diferenças foram consideradas significativas em $P < 0,05$ e as tendências foram definidos em $0,05 P \leq 0,1$. A magnitude de I² foi considerada baixa, moderada ou alta heterogeneidade quando valores estavam na ordem de 25, 50 e 75%, respectivamente [27].

2.6. Viés de publicação.

Investigamos a possibilidade de viés de publicação de forma gráfica (gráfico de funil) e estatística (testes de correlação de Begg e de regressão de Egger) para cada um dos dois resultados de interesse. Viés foi considerado presente com base na avaliação visual do gráfico e se, pelo menos, um dos testes estatísticos fosse significativo ($P < 0,10$). Na evidência de viés, o método "trim-and-fill" foi usado para estimar e corrigir um eventual viés de publicação [28].

2.7. Meta-regressão

Análise de meta-regressão univariada para efeitos aleatórios considerou os efeitos de (1) randomização (citada, descrita ou não citada/descrita), (2) fatores de confusão identificados e controlados (não, sim ou não aplicável), (3) ano de publicação do manuscrito, (4) país, (5) estação do ano, (6) família (*Bryconidae*, *Serrasalminae*, *Pimelodidae*), (7) gênero (*Brycon*, *Piaractus*, *Rhamdia*), (8) quem realizou o procedimento (não relatado, produtor, pesquisador), (9) tipo de crioprotetor (base ou álcool), (10) crioprotetor interno (ME₂SO e metanol), (11) porcentagem de inclusão do crioprotetor interno na solução e (12) tamanho da amostra em cada resultado de interesse. As variáveis foram analisadas separadamente devido ao baixo número de estudos disponíveis para cada desfecho de interesse.

2.8. Meta-análise cumulativa e estudos influentes

Uma MA cumulativa busca avaliar o efeito na MD toda vez que um novo resultado potencial é publicado. Essas análises são mais frequentemente usadas para exibir o padrão da evidência ao longo do tempo [18]. Análise de sensibilidade busca identificar se um determinado estudo tem um efeito substancial no DM através da remoção e

inserção manual de um estudo por vez e avaliar se essa medida de efeito comum mudou em $\pm 30\%$.

3 Resultados

3.1. Identificação de estudos e extração de dados

A pesquisa bibliográfica identificou 3.369 citações. Dessas, 97 foram selecionadas como citações úteis com probabilidade de conter dados, mas apenas cinco foram consideradas como elegíveis e foram incluídos para avaliação da solidez metodológica e extração de dados (Tabela 2). Dos quatro autores contatados que apresentaram seus resultados graficamente ou sem dados suficientes nos manuscritos, dois retornaram com dados numéricos das análises.

O tratamento avaliado na revisão foi anormalidades espermáticas (n = 5 estudos), classificadas em normais (n = 5), primárias (n = 5) e secundárias (n = 5). Um total de 44 peixes foram utilizados nestes estudos, das espécies *Brycon orbignyanus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Rhamdia quelen*. No total, cinco publicações foram incluídas neste RS-MA que compreendeu 5 estudos e 15 comparações únicas de tratamento. A tabela 3 lista as características dos estudos incluídos.

Tabela 2. Um resumo descritivo de cada estudo relevante incluído na meta-análise sobre anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos.

Estudo ⁽¹⁾	População (número amostral)	Crioprotetor interno	Parâmetro avaliado
Streit et al. (2006)	<i>P. mesopotamicus</i> (12)	Me ₂ SO	Anormalidades
Streit et al. (2009)	<i>P. mesopotamicus</i> (11)	Me ₂ SO	Anormalidades
Galo et al. (2011)	<i>B. orbignyanus</i> (10)	Me ₂ SO	Anormalidades
da Costa et al. (2019)	<i>R. quelen</i> (5)	Metanol	Anormalidades
Galo et al. (2019)	<i>P. mesopotamicus</i> (6)	Me ₂ SO	Anormalidades

⁽¹⁾ Todos os estudos que fizeram parte da MA foram produzidos no Brasil. Me₂SO= dimetilsulfóxido.

Tabela 3. Características descritivas das publicações de relatórios dos estudos incluídos na revisão sistemática-meta-análise sobre anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos.

Variável	Categoria	Número de estudos
Design do estudo	Estudo controlado	5
Tipo de publicação	Revisado por pares	5
Tratamento	Criopreservação	5
Data da publicação	2000 – 2010	2
	2011 – 2019	3
Família	<i>Bryconidae</i>	1
	<i>Serrasalminae</i>	3
	<i>Pimelodidae</i>	1
Gênero	<i>Brycon</i>	1
	<i>Piaractus</i>	3
	<i>Rhamdia</i>	1
Quem realizou o procedimento	Produtor	0
	Pesquisador	0
	Não reportado	5
Crioprotetor interno	Base (ME2SO)	4
	Álcool (Metanol)	1
Parâmetro avaliado	Morfologia espermática	5

3.2. Risco de viés

A avaliação do risco de viés com os critérios da Cochrane Collaboration (Tabela 4) e a caracterização metodológica dos estudos incluídos (Tabela 5). O viés de desempenho não era claro em 100% dos estudos que analisaram anormalidades morfológicas, e a abordagem para cegar avaliador de resultados não foi relatado, aumentando o risco de viés de detecção para ambos. Com relação ao risco de viés de atrito, esse domínio foi baixo para todos os estudos incluídos.

Tabela 4. Resumo da avaliação metodológica e/ou notificação das publicações que relatam os estudos incluindo nesta revisão.

Variável	Avaliação	N de estudos
O tamanho amostral foi justificado?	Sim	0
	Não	5
Como as amostras foram distribuídas nos tratamentos?	Aleatorizados	0
	Aleatorização citada	2
	Sistematicamente	3
	Conveniência ou não reportado	0
O protocolo de intervenção foi descrito em detalhes suficientes para ser replicado?	Sim	0
	Não	0
	Citação de referência	5
O autor relatou cegamento ao avaliar os resultados?	Sim	0
	Não	5
Os fatores de confusão foram identificados, controlados ou testados?	Sim	0
	Não	5
	Não aplicável	0
A análise estatística foi descrita adequadamente para que possa ser reproduzida?	Sim	5
	Não	0
	Referências citadas	0

Tabela 5. Validade interna dos estudos incluídos na revisão sistemática de anormalidades morfológicas no sêmen criopreservado de espécies de peixes neotropicais sul americanas usando a ferramenta Cochrane Collaboration para avaliar o risco de viés.

Autor e ano	Geração de sequência	Ocultação de alocação	Cegamento dos envolvidos	Cegamento de avaliação dos resultados	Dados incompletos	Exposição seletiva
Streit et al. (2006)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Streit et al. (2009)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Galo et al. (2011)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
da Costa et al. (2019)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa
Galo et al. (2019)	Incerto	Incerto	Incerto	Alta	Baixa	Baixa

3.3. Meta-análise

Cinco publicações relatando o efeito da inclusão de 10% de crioprotetor nos tratamentos, geraram cinco estudos incluídos na MA. Não houve exclusões devido à falta de aleatorização das amostras ou falta de ajuste para agrupamentos (peixes) e fatores de confusão.

3.3.1. Efeito da criopreservação na percentagem de anormalidades

Células normais: A variação da média geral de células normais sob a inclusão de 10% de crioprotetor apresentou alta heterogeneidade ($I^2 = 78,3\%$), favorecendo o grupo “sêmen fresco”, com relação ao grupo “sêmen criopreservado” (IC 95% = 0,16; 2,60; $P=0,026$). Na combinação dos 5 ensaios iniciais, a heterogeneidade manteve-se alta, apresentando um I^2 de 87,7%. Revelando um aumento de anormalidades primárias no sêmen tratado com relação ao controle.

Células com anormalidades primárias: a combinação dos estudos (n: 4 ensaios) que avaliaram a presença de anormalidades primárias em sêmen criopreservado com 10% de ME2SO (DM: 1,74; IC 95%= - 3,72; - 0,09, $P= 0,021$) apresentou alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2= 85,6\%$).

Células com anormalidades secundárias: não houve evidência significativa (DM =0,26; $P= 0,763$; IC95%: -1,43- 1,95) de efeito geral da criopreservação no aumento de células com anormalidades secundárias, e heterogeneidade alta entre os estudos ($I^2= 86,9\%$)

3.4. Viés de publicação

Os estudos incluídos em nossa MA são altamente heterogêneos e, por isso, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados. Houve evidência de viés de publicação em estudos que avaliaram a percentagem de células, observadas pela assimetria do no “funnel plot”, teste de Egger significativo ($P=0,030$) mostrando existir evidência de exclusão de estudos pequenos e não significativos, além de estimação maior para estudos pequenos que para estudos grandes, e teste de Begg com evidência significativa de viés de publicação. Para os estudos que que avaliaram anormalidades primárias e secundárias existe alguma evidência de assimetria no “funnel plot”, porém dados estatísticos dos testes Egger e Begg não foram significativos.

Tabela 6. Análises estratificadas realizadas na meta-análise do indicador anormalidades morfológicas em sêmen criopreservado de peixes neotropicais sul-americanos.

Contraste	Células Normais			Anormalidades Primárias			Anormalidades Secundárias		
	n ^a	DM (%); Valor P	I ²	n ^a	DM (%), Valor P	I ²	n ^a	DM (%), Valor P	I ²
		(CI95%)	(Valor P)		(CI95%)	(Valor P)		(CI95%)	(Valor P)
Controle vs. 10% de inclusão de crioprotetor	5	1,38; P= 0,026 (0,16; 2,60)	78,3% (0,001)	5	-1,91; P= 0,039 (-3,72; 0,09)	87,7% (0,000)	5	0,26; P= 0,763 (-1,43; 1,95)	88,6% (0,000)
Controle vs. Inclusão de 10% ME2SO	4	1,20; P=0,002 (0,42; 1,98)	57,5% (0,070)	4	-1,74; P= 0,021 (-3,22; -0,25)	85,6% (0,000)	4	0,26; P= 0,518 (-1,43; 1,95)	86,9% (0,000)

n^a: número de estudos; I²: porcentagem da variação total nos estudos devido à heterogeneidade e não ao acaso.

DM: diferença média. DM positivo significa que o segundo elemento do contraste é menor que o primeiro, enquanto DM negativo significa que o segundo elemento de contraste é maior do que o primeiro elemento.

3.5. Análise de meta-regressão

Para as percentagens de anormalidades, cinco estudos (n= 5 ensaios) considerando 15 combinações, foram utilizadas na análise de meta-regressão. Na percentagem de células normais, cinco ensaios foram submetidos a análise, observando-se que 21,7% da heterogeneidade, devido à variabilidade entre os estudos. O estudo que utilizou metanol como crioprotetor apresentou significativamente um maior percentual de células normais (42,9%) após a criopreservação quando comparado aos estudos que utilizaram crioprotetor ME2SO (P=0,049).

Para a percentagem de células anormais primárias, cinco estudos (n = 5 ensaios) foram submetidos à meta-regressão univariada. A análise detectou 12,30% da heterogeneidade, devido á variabilidade entre os estudos. O crioprotetor metanol aumentou a ocorrência de morfologia primária a um nível de 95,7% em relação ao ME2SO (P= 0,046). Já na percentagem de células anormais secundárias, a análise detectou que 11,40% da heterogeneidade, devido à variabilidade entre os estudos. O crioprotetor metanol tendeu aumentar a percentagem de células com anormalidades secundária em 40,4% em relação ao ME2SO (P=0,082).

3.6. Meta-análise cumulativa e estudos influentes

Na meta-análise cumulativa, para os três ensaios que combinaram a percentagem de células normais pré e pós criopreservação, não houve evidências de que os estudos influenciaram nos resultados obtidos na MA.

Para estudos que avaliaram percentagem de células com anormalidades primárias houve evidência de mudança no ponto estimado dos tratamentos agrupados (DM = -1,91%). A remoção de dois dos estudos [30,15] diminuiu a DM para -2,52% e -2,65%, respectivamente. Já a remoção de outro estudo [1] aumentou a estimativa combinada, ficando a DM= -1,28%. Para a percentagem de células com anormalidades secundárias, a análise de sensibilidade mostrou que a remoção de três estudos [15,9,1] aumentou a DM de 0,26% para 0,81; 0,46; -0,32, respectivamente. Por outro lado, a remoção de [30] diminuiu a estimativa combinada (DM = -0,15).

4 Discussão

Esta é a primeira RS-MA que buscou sintetizar as informações disponíveis na literatura sobre a influência da criopreservação na morfologia celular de espermatozoides de espécies de peixes neotropicais sul-americanas. O desafio dos estudos que avaliam a criopreservação para a conservação de espécies de peixes

neotropicais sul-americanas está em fornecer informações detalhadas da metodologia e padronizando o desenvolvimento de suas pesquisas. Uma alta variabilidade em nossa MA já era esperada, devido ao uso apenas de estudos publicados, os quais não possuem um número expressivo nas bases de busca, assim como do baixo número de estudos incluídos utilizando espécies diferentes. Todavia, as informações colhidas neste estudo permitem sintetizar as informações acerca do sêmen criopreservado de espécies neotropicais sul-americanas.

A comparação entre manuscritos que geraram os dados da nossa MA sugere um aumento significativo da ocorrência de anormalidades morfológicas primárias nos animais com sêmen criopreservado, já para anormalidades secundárias não foi detectado diferença significativa entre o sêmen criopreservado e fresco. Esta observação é importante do ponto de vista de como são classificadas as anormalidades espermáticas de peixes. Os autores incluídos em nossa MA classificam as anormalidades espermáticas como primárias e secundárias, de acordo com Blomm [23] e Barth & Oko [24], sugerida para mamíferos. Neste caso, as alterações primárias estão relacionadas ao processo de espermatogênese e com potencial de infertilidade em mamíferos (critério maiores), já as secundárias seriam relativas a manipulação do sêmen após a coleta e possuem pouca ou nenhuma influência na fertilização (critério menores).

A observação de Hezavehei et al. [31] é pertinente quanto ao processo de criopreservação e deste modo as alterações estruturais nos espermatozoides de peixes devem ser tratadas com maior precisão. Neste caso, os autores atribuem os defeitos à formação de cristais gelo durante o congelamento de fluidos extracelulares, o que resulta em expansão das membranas celulares. Este fato relacionado, juntamente com alterações osmóticas do meio, pode causar danos à estrutura da membrana lipídica, levando a mudanças de tensão e vazamento iônico da membrana plasmática, resultando em alterações morfológicas. Os efeitos da baixa osmolaridade já foram citados em alguns estudos, como responsáveis por produzir alterações estruturais importantes nos espermatozoides. Neste caso, por exemplo, a baixa osmolaridade induz o inchaço da cabeça do espermatozóide, levando à ruptura da membrana plasmática [13], podendo causar o enrolamento do flagelo [14]. Este fato foi suscitado na observação de Streit Jr. et al. [30]. Estes autores sugeriram que outros três danos (cauda quebrada, cauda curta e microcefalia) em peixes, podem estar relacionados aos processos durante criopreservação, como exposição e tempo de

exposição à solução crioprotetora, toxicidade ao crioprotetor e a taxa de resfriamento e descongelamento. Ao observar o sêmen de *P. mesopotamicus*, pré e pós congelado Galo et al. [1] sugeriu que o aumento de anormalidades primárias, pós criopreservação, é geralmente determinado pela redução da temperatura ou pela exposição à toxicidade da solução crioprotetora.

Seguramente um dos principais problemas quando os espermatozoides apresentam anormalidades espermática, é a redução da efetiva fertilização. As anormalidades morfológicas da peça intermediária e do flagelo de espermatozoides de *Prochilodus lineatus* foram atribuídas por Kavamoto et al. [32] como responsáveis pelas alterações progressivas da motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios reduzindo assim a taxa de fertilização. Isso ocorre porque os espermatozoides dos peixes de água doce preservam sua motilidade por um período duração muito curto [33], durante a qual eles devem penetrar no oócito através da micrópila [34]. Assim, o aumento da quantidade de lesões morfológicas causadas pelo processo de criopreservação nos espermatozoides pode gerar uma fertilização ineficaz [9].

Na aplicação da análise da MR foi possível detectar que o crioprotetor metanol aumentou a incidência de anormalidades morfológicas após criopreservação quando comparada ao ME₂SO, em uma mesma concentração. O metanol de acordo com Elliott et al. [35], possui menor peso molecular (32g/mol), e com isso a velocidade de permeabilidade celular é mais rápida em relação aos demais crioprotetores como o ME₂SO (78g/mol). Todavia, devemos ter parcimônia quando analisamos este resultado, pois apenas um estudo utilizando metanol [9] foi incluído na MA. Outro aspecto importante que deve ser considerado, é o efeito menos tóxico do metanol em relação ao Me₂SO, quanto usado como crioprotetor para sêmen de diferentes espécies de bagres, como por exemplo: *Pseudoplatystoma corruscans* [36]; *Clarias gariepinus* [37] e *R. quelen* [38].

O tamanho médio do efeito reduziu após a remoção de dois estudos [30,15] e aumentou com a remoção de Galo et al. [1] para anormalidades primárias. Os estudos que apresentaram diminuição da média geral, têm em comum o protocolo de criopreservação composta por: 10% Me₂SO+5% glicose+20% gema de ovo. A redução da DM para -2,52% após a retirada manual de Streit et al. [30] e -2,65% para Galo et al. [15] observada em nossa análise, sugere a eficácia na proteção dos espermatozoides durante a criopreservação, com o uso do protocolo 10% Me₂SO+5%

glicose+20% gema de ovo. Já a retirada de Galo et al. [1] apresentou um aumento da média geral em -1,28%, esse estudo utilizou um protocolo semelhantes ao dos estudos anteriores citados, porém com apenas a metade do volume de gema de ovo (10%). Segundo Carosfeld et al. [36], a gema de ovo é bastante utilizada em protocolos de criopreservação, pois possui em sua composição a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas, que atuam na estabilização da membrana reduzindo os danos causados pelo processo de criopreservação. Tanto Galo et al. [1], quanto Streit et al. [30] criopreservaram sêmen de *P. mesopotamicus*, assim podemos supor que para estas espécies soluções com maior inclusão de gema de ovo são mais efetivas na proteção da célula durante o processo de congelação.

Considerando o processo de criopreservação, além de algumas particularidades dos espermatozoides de peixes, como; tamanho, formatos, processo de ativação dentre outros, produzem respostas diferente em relação os espermatozoides de mamíferos. A partir dos dados obtidos e analisados na MA, uma reclassificação das anormalidades espermáticas de peixes após a criopreservação seria recomendando, e não mais a classificação para mamíferos de Blomm [23] e Barth & Oko [24]. No estudo desenvolvido por Streit et al. [30], os autores já se mostravam surpresos pelo aumento de alterações morfológicas primárias nos espermatozoides de *P. mesopotamicus* após a criopreservação, sugerindo naquele momento uma nova classificação para peixes após este processo. No artigo de Miliorini et al. [39] os autores sugeriram incluir a efetividade dos espermatozoides pós criopreservação com anormalidades em uma nova classificação morfológica. Recentemente, da Costa et al. [9] também sugeriram uma reclassificação para os espermatozoides de peixes, após observar um aumento no percentual de anormalidades primárias de espermatozoides de *R. quelen*, após a criopreservação. A partir das evidências obtidas em nosso estudo, reforçamos a necessidade de uma nova classificação morfológica para espermatozóides de peixes após a criopreservação.

A abordagem dos resultados e descrições metodológicas nos estudos geralmente limitam nossa capacidade de resumir os dados, como a ocorrência de descrição incompleta nas medidas de resultados. No entanto, foram realizadas tentativas de contato com pesquisadores da área, conforme sugerido por Lean et al. [19]. Excluimos três publicações em texto completo que continham dados sobre avaliação de anormalidades morfológicas por ausência de dados do tratamento controle, e ausência de descrição metodológica como explicado em a seção de metodologia. O

baixo número de estudos incluídos, assim como o número de animais analisados nos estudos, é um desafio para a precisão das análises.

5 Conclusão

Em nosso estudo ficou evidente o aumento do percentual de anormalidades espermáticas após a criopreservação, principalmente de anormalidades primárias de acordo com a classificação clássica para mamíferos. Uma classificação para anormalidades espermática de peixes pós criopreservação deve ser elaborada.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- [1] Galo JM, Streit-Junior DP, Oliveira CA, Povh JP, Fornari DC, Digmayer M, Ribeiro RP. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. Braz J of Bio 2019; 79: 438-45.
- [2] Mazur P, Leibo SP, Seidel Jr. GE. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. Bio of reprod, 2008; 78: 2-12.
- [3] Aramli M, Golshahi K, Nazari R, Golpour A, & Aramli S. Influence of Glutamine Supplementation on Motility and Fertilization Success of Frozen–Thawed Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Sperm. Repr in domest ani 2016; 51: 474-77.
- [4] Leite LV, Oliveira FCE, Nunes LT, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB. Criopreservação de sêmen de tambaqui com Acp® adicionado de gema de ovo. Rev. Bras Eng Pesca 2011; 6: 23-9.
- [5] Carvalho MAM, Linhares FRA, Nunes JF, Salgueiro CCM, Costa RB, Sales RO, Coconut water as extender for sperm of freshwater fish with external fertilization. Rev Bras Hig San Anim 2014; 8: 203–22.
- [6] Pastrana YM, Streit DP, Garcia RRF, Becker BS, Rodrigues JL, Godoy L. A fructose-based extender protects *Colossoma macropomum* spermatozoa against chilling injuries. Aqua Res 2018; 50: 521-28.
- [7] Linhares FRA, Oliveira-Araújo MS, Nunes JF, Carvalho MAM, Campello CC, Salmito-Vanderley CSB. Effect of vitamins added to the ACP-104 extender on the quality of cryopreserved semen of common carp (*Cyprinus carpio*). Arch Bras Med Vet e Zoot 2017; 69: 980-88.

- [8] Zhang, X, Ma J, Linmiao, L, Jiang H, Jinping C. Effects of Different Cytoprotectants Combination on Sperm Survival, Fertility and Embryo Development in Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Anim and Vet Scien* 2018; 6: 51-7.
- [9] Da Costa BB, Marques LS, Lassen PG Rodrigues RB, Streit DP. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *J Applied Ichth* 2019; 35: 987-93.
- [10] Figueroa E, Valdebenito I, Farias JG. (2016). Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquac Res* 2016; 47: 1691-705.
- [11] Viveiros ATM, Leal MC, França TS, Almeida ILG, Isaú ZA. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. *Animal repr Sci* 2016; 173: 73–9.
- [12] Cosson, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J of Fish Bio* 2010; 76: 240–79.
- [13] Poupard GP, Gatti JL, Cosson J, Jeulin C, Fierville F, Billard R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *Reproduction* 1997; 110: 315–27.
- [14] Ramu S, Jeyendran RS. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. In *Spermatogenesis* (pp. 21–25). Totowa, NJ: Humana Press. 2013
- [15] Galo JM, Streit-Junior DP, Sirol R, Ribeiro R, Digmayer M, Andrade V, Ebert A. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Braz J of Biol* 2011; 71: 693–99.
- [16] Sanches EA, Neumann G, De Toledo CPR, Bombardelli RA, Piana PA, Romagosa E. Temperature and storage period over spermatic parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquac Research* 2013; 44: 534–41.
- [17] Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health Care* 2nd ed. London, UK: MBJ Publishing Group; 2001.
- [18] Borenstein M, Hedges L, Higgins JPT, Rothstein HR. *Introduction to Meta-Analysis*. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK: The Atriu; 2009.
- [19] Lean IJ, Rabiee AR, Duffield TF, Dohoo IR. Invited review: use of meta-analysis in animal health and reproduction: methods and applications. *J of Dairy Sci* 2009; 92: 3545–565.
- [20] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman D. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *Journal of Clinical Epidemiology* 2009; 62: 1006-012.

- [21] Canozzi MEA, Mederos A, Manteca X, Turner S, McManus C, Zago D, Barcellos JOJ. A meta-analysis of cortisol concentration, vocalization, and average daily gain associated with castration in beef cattle. *Research in Vet Sci* 2017; 11: 430-43.
- [22] Mederos A, Waddell L, Sánchez J, Kelton D, Peregrine AS, Menzies P, Van Leeuwen J, Rajic AA. systematic review-meta-analysis of primary research investigating the effect of selected alternative treatments on gastrointestinal nematodes in sheep under field conditions. *Preventive Veterinary Medicine* 2012; 104: 1-14.
- [23] Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm deffects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk vetmed* 1973; 25: 383-339.
- [24] Barth Ad, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State: University Press; 1989.
- [25] Higgins JPT, Altman DG, Gotzsche PC, Juni P, Moher D, Oxman AD. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *Bmj* 2011; 343: 1- 9.
- [26] Der Simonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials*; 1986; 7: 177–88.
- [27] Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *British Medical Journal* 2003; 327: 557-60.
- [28] Duval S, & Tweedie R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000; 56: 455-63.
- [29] Streit DP, Benites C, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Caldieri RF. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciên Animal Bras* 2006; 7: 289-97.
- [30] Streit DP, Oliveira AC, Ribeiro RP, Sirol RN, Moraes GV, Galo JM, Digmayer M. Motilidade, vigor e patologia seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Bol Inst Pesca* 2009; 35: 159–67.
- [31] Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Rep Biom Online* 2018; 37: 327-39.
- [32] Kavamoto ET, Barnabe VH, Campos BES, Andrade-Talmelli EF. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881). *Bol Inst Pesca* 1999; 25: 61–6.
- [33] Billard R, Cosson MP. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool* 1992; 261: 122–31.

- [34] Suquet M, Billard R, Cosson J, Normant Y, Fauvel C. (1995). Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture* 1995; 133: 83–90.
- [35] Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryo* 2017; 76: 74-91.
- [36] Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni Filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Bio* 2003; 63: 472-89.
- [37] Viveiros ATM. (2011). Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: Tiersch TR., Green CC, editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Louisiana: World of Aquaculture Society; 2011, p. 387- 97.
- [38] Adames MS, De Toledo CPR., Neumann G, Buzzi AH, Buratto CN, Piana PA, Bombardelli RA. Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Rep Sci* 2015; 161: 119-28.
- [39] Miliorini AB, Murgas LDS, Rosa PV, Oberlender G., Pereira GJM, da Costa DV. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Res* 2011; 42: 177–87.

Capítulo IV

Considerações Finais

Um dos principais objetivos da revisão sistemática e da meta-análise é reduzir o grau de incerteza sobre um determinado assunto. Essas ferramentas permitem que se obtenham resultados a partir da compilação de dados disponíveis na literatura, com redução do risco de viés de publicação e síntese ponderada dos resultados. A presente revisão sistemática e meta-análise foi o primeiro estudo a avaliar os resultados disponíveis na literatura sobre os parâmetros de anormalidades espermática e motilidade de sêmen criopreservado de espécies neotropicais de água doce. Entretanto, algumas limitações foram identificadas durante as avaliações. Na revisão sistemática, diante do elevado número de publicações recuperadas pela busca, a não avaliação da literatura cinza (teses, dissertações e anais de congressos), foi considerada por nós uma limitação. Uma vez que, para algumas respostas, por exemplo anormalidades espermáticas secundárias, o número de comparações foi insuficiente para identificar efeito significativo da criopreservação nos espermatozoides. Essa falta de literatura cinza, se deu em parte, pela ausência de bases que centralizem teses e dissertações publicadas nos países de interesse. Também a dificuldade em aplicação da chave de busca nas bases que dispõem de literatura cinza, bem como uso de filtros para a seleção de estudos que causariam a descaracterização metodológica do presente estudo.

Foram identificadas também, falhas na descrição da metodologia utilizada nos trabalhos, como nos procedimentos utilizados para alocação dos animais ou amostras nos tratamentos. Algumas publicações não forneceram dados necessários para o objeto de estudo, como falta da informação sobre número de animais utilizados, critério para formação e distribuição do amostras de sêmen em *pools*, descrição detalhada de soluções, que fizeram com que os estudos fossem excluídos da MA. Como sugestão a novos estudos, apontamos a necessidade do detalhamento da metodologia e protocolo utilizados, assim como a padronização no desenvolvimento de suas pesquisas, tornando os resultados mais facilmente comparáveis. Acrescentamos também o uso crítico e cuidadoso de palavras-chave, para que estejam alinhadas com o assunto tema do estudo, facilitando assim o acesso a este pelas buscas em bases de dados de pesquisa.

Frente a essas constatações, é importante que os pesquisadores atentem para a importância do fornecimento completo dos dados experimentais em suas publicações, assim como a necessidade de incluir como material suplementar os dados brutos da pesquisa, ou publicá-las na forma de data-in-brief. Permitindo assim que suas publicações possam ser completamente entendidas, repetidas e utilizadas em futuros estudos. Diante da importância desse tema, sugere-se que trabalhos semelhantes a esse sejam realizados no futuro, assim como incluir outros crioprotetores, técnicas e espécies de interesse a aquicultura. Além disso, outros parâmetros de qualidade espermáticas podem ser avaliados sob o ponto de vista da criopreservação, destacando-se integridade da célula e DNA, bem como variáveis qualitativas obtidas por software de análise espermática computadorizada.

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**, Amsterdam, v. 161, p. 119-28, 2015.
- AGUIAR, T. *et al.* Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 80– 93, 2012.
- ALAVI, S. M.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, Chichester, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.
- ALAVI, S. M. *et al.* Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius L.*). **Theriogenology**, New York, v. 72, n. 1, p. 32-43, 2009.
- ALMEIDA-MONTEIRO, P. S. *et al.* Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 2669-2679, 2017.
- ARAMLI, M. S. *et al.* Influence of glutamine supplementation on motility and fertilization success of frozen–thawed Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 474-77, 2016.
- ARFUSO, F. *et al.* Water temperature influences growth and gonad differentiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758). **Theriogenology**, New York, v. 88, p. 145-151, 2017.
- ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVATH, A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 69-76, 2017.
- ATENCIO-GARCIA, V. J. *et al.* Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 19, n. 2, p. 87–94, 2017.
- ATENCIO-GARCIA, V. J. *et al.* Insemination of bocachico fish (*Prochilodus magdalenae*) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 28, n. 4, 2015.
- ATENCIO-GARCIA, V. J. *et al.* Evaluación de dimetilacetamida como criopro- tector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 45, n. 2, p. 151-158, 2013.
- AYE, M. *et al.* Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1905-1912, 2010.

BARTH A. D.; OKO R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BAUST, J. G. The management of mammalian cells at low temperature. **Cell Preservation Technology**, New Rochelle, v. 6, p. 111-112, 2008.

BERWANGER, O. *et al.* Como avaliar criticamente revisões sistemáticas e metanálises. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 475-80, 2007.

BEST, B. P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. **Rejuvenation Research**, Larchmont, v. 18, n. 5, p. 422-36, 2015.

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

BILLARD R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, p. 1-9, 2004.

BILLARD, R. *et al.* Broodstock management and seed quality-general considerations. *In*: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 1-24.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, v. 25, p. 383-339, 1973.

BOBE, J.; LABBE, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, p. 535-548, 2009a.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Chilled storage of sperm and eggs. *In*: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. (ed.). **Methods in reproductive aquaculture – marine and freshwater**. Boca Raton: CRC, 2009b. p. 219-231.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, p. 535-548, 2010.

BORGES, A. M. *et al.* Ultrastructure and sperm cryopreservation of the amazon catfish (*Leiaris marmoratus*) in captivity. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 72, n. 1, p. 253-262, 2020.

BORENSTEIN, M. *et al.* **Introduction to meta-analysis**. Chichester: John Wiley, 2009.

BORYSHPOLETS, S. *et al.* Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. **Theriogenology**, New York, v. 80, n. 7, p. 758-65, 2013.

BROMAGE, N. R. Broodstock management and seed quality – general considerations. *In*: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (ed.). **Broodstock**

management and egg and larval quality. Oxford: Institute of Aquaculture, 1995. p. 1-24.

BROWNE, R. K. *et al.* Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. **Theriogenology**, New York, v. 83, n. 1, p. 1-13, 2015.

CABRITA, E. *et al.* The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, p. 189-195, 2011.

CABRITA, E. *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 432, p. 389-401, 2014.

CAROLSFELDT, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.

CARNEIRO, P. C. F. *et al.* Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, London, v. 33, n. 3, p. 285-393, 2012.

CARVALHO, A. F. S. *et al.* Effect of caffeine added to the activating solution on sperm motility of fresh and thawed semen of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, and Curimba, *Prochilodus lineatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 45, n. 1, p. 75-81, 2014a.

CARVALHO, M. A. M. D. *et al.* Água de coco como diluente para o sêmen de peixes de água doce de fertilização externa. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, n. 4, p. 203-222, 2014b.

CASTRO, A. A. Revisão sistemática: análise e apresentação dos resultados. *In*: CASTRO, A. A. **Revisão sistemática com ou sem metanálise**. São Paulo: AAC, 2001. p. 81-122.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CERNICCHIARO, N. *et al.* Meta-analysis of the effects of laidlomycin propionate, fed alone or in combination with chlortetracycline, compared with monensin sodium, fed alone or in combination with tylosin, on growth performance, health, and carcass outcomes in finishing steers in North America. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 94, p. 1662-1676, 2016.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, New York, v. 64, p. 457-468, 2005.

COSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *prochilodus-scrofa* and *salminus-maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, p. 240–279, 2010.

COSSON, J. *et al.* Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. *In*: GAGNON, C. (ed.). **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Paris: Cache River, 1999. p. 161–186.

COSTA, B. B. *et al.* Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 35, p. 987-993, 2019.

COSTA, B. B.; STREIT JUNIOR, D. P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciência Animal**, [Fortaleza], v. 29, n. 2, p. 93-109, 2019.

COWARD, K. *et al.* Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 12, p. 33-58, 2002.

CRUZ-CASALLAS, P. E. *et al.* Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 35, n. 4, p. 535 - 543, 2004.

CRUZ-CASALLAS, P. E. *et al.* Evaluación de diferentes crio-protectores para la crioconservación de esper-matozoides de yamú *Brycon amazonicus*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 152-159, 2006.

DADRAS, H. *et al.* Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 729-740, 2017.

DER SIMONIAN, R.; LAIRD, N. Meta-analysis in clinical trials. **Controlled Clinical Trials**, New York, v. 7, n. 3, p. 177–188, 1986.

DZYUBA, V.; COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 14, n. 3, p. 165-175, 2014.

DUVAL, S.; TWEEDIE, R. Trim and fill: a simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. **Biometrics**, Alexandria, VA, v. 56, n. 2, p. 455-463, 2000.

EGGER, M.; SMITH, G. D.; ALTMAN, D. G. **Systematic reviews in health care**. 2nd ed. London: MBJ Publishing Group, 2001.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v. 76, p. 74-91, 2017.

FABBROCINI, A *et al.* Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, San Diego, v. 40, n. 1, p. 46-53, 2010.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, San Diego, v. 60, n. 3, p. 45-53, 2010.

FAHY, G. M. *et al.* Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 22-35, 2004.

FAO – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **The state of world fisheries and aquaculture 2018 (SOFIA)**. Rome: FAO, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2020.

FAUSTINO, F. *et al.* Spermatozoon ultrastructure and semen parameters of Brycon vermelha (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, p. 17-23, 2015.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 636-643, 2010.

FARIAS, J. O. *et al.* Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, Areia, PB, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

FELIZARDO, V. O. *et al.* Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmencriopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, p. 1255-1262, 2011.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J. G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 1691-1705, 2016.

FIGUEROA, E. *et al.* Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. **Reviews in Aquaculture**, Richmond, v. 9, n. 1, p. 76-87, 2017.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 30, n. 6, p. 820-832, 2018.

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

GALLEGO, V. *et al.* Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 44, n. 6, p. 1457-1467, 2018.

GALO, J. M. *et al.* Sperm quality of the Amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 74, n. 4, p. 933-938, 2014.

GALO, J. M. *et al.* Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 79, n. 3, p. 438-445, 2019.

GALO, J. M. *et al.* Spermatic abnormalities of piraicanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 3, p. 693-699, 2011.

GARCIA, R. R. F. *et al.* Different extenders solutions for tambaqui semen cooling. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 51, n. 6, p. 780-784, 2016.

GARCIA, R. R. F. *et al.* Functional integrity of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 13, n. 3, p. 599-606, 2015.

GODINHO, H. P.; VIVEIROS, A. T. M. Current status of sperm cryopreservation of brazilian characiform fishes. *In*: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 875-884.

GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.

HEZAVEHEI, M. *et al.* Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproduction Biomedicine Online**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.

HIGGINS, J. P. T.; GREEN, S. **Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1.0**. Oxford: The Cochrane Collaboration, 2011.

HIGGINS, J. P. T. *et al.* The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. **British Medical Journal**, London, v. 343, [art.] d5928, [p. 1-9], Oct. 2011.

HIGGINS, J. P. T.; WHITE, I. R.; ANZURES-CABRERA, J. Meta-analysis of skewed data: Combining results reported on log-transformed or raw scales. **Statistics in Medicine**, Chichester, v. 27, n. 29, p. 6072-6092, 2008.

HIGGINS, J. P. T.; WHITE, I. R.; WOOD, A. M. Imputation methods for missing outcome data in meta-analysis of clinical trials. **Clinical Trials**, London, v. 5, n. 3, p. 225-239, 2008.

HIGGINS, J. P. T. *et al.* Measuring inconsistency in meta-analysis. **British Medical Journal**, London, v. 327, n. 7414, p. 557-560, 2003.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 729-734, 2005.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, San Diego, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.

ISACHENKO, V. *et al.* Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa: fish as a model of human. **Andrologia**, Berlin, v. 51, n. 1, p. 131-166, 2019.

JAIN, J. K.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 86, p. 1037-1046, 2006. Supl. 4.

KAVAMOTO, E. T.; BARNABÉ, V. H. **Efeito da estimulação hormonal sobre as características seminais, desenvolvimento dos testículos e ocorrência de células espermáticas anormais no sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 1998. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. *In*: ALAVI, S. M. H. *et al.* (ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science, 2008. p. 347-396.

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

LAHNSTEINER, F. *et al.* Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. **The Progressive Fish-Culturist**, Fort Collins, v. 58, n. 3, p. 149-159, 1996.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1/2, p. 130-140, 2010.

LEAN, I. J. *et al.* Invited review: use of meta analysis in animal health and reproduction: methods and applications. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 3545-3565, 2009.

LEITE, J. S. *et al.* Seasonal variation in seminal quality in Brazilian Bocachico (Teleostei, Characiformes). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 3, p. 759-766, 2018.

LEINZ, D. R. **Caracterização e criopreservação de sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

- LEVINE, N. D.; MARQUARDT, W. C. The effect of glycerol and related compounds on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 2, p. 100-107, 1955.
- LINHARES, F. R. A. *et al.* Effect of vitamins added to the ACP-104 extender on the quality of cryopreserved semen of common carp (*Cyprinus carpio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 4, p. 980-988, 2017.
- LIU, Q. *et al.* An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 37, p. 289–297, 2006.
- MARIA, A. N. *et al.* Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, San Diego, v. 70, n. 2, p. 109-114, 2015.
- MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Fish semen cryopreservation in Brazil: state of the art and future perspectives. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. *In*: TAVARES-DIAS, M. (org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. cap. 3, p. 47-63.
- MARIA, A. N. *et al.* Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, 2006.
- MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, 2004.
- MARTINEZ-PARAMO, S. *et al.* Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 472, p. 156-177, 2017.
- MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL, G. E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 78, n. 1, p. 2-12, 2008.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 247, n. 3, p. 125-142, 1984.
- MEDEROS, A. *et al.* A systematic review-meta-analysis of primary research investigating the effect of selected alternative treatments on gastrointestinal nematodes in sheep under field conditions. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 104, p. 1-14, 2012.

MELO-MACIEL, M. A. P. *et al.* Aloe vera in the cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 3, p. 945-949, 2015.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, San Diego, v. 8, p. 173-183, 1971.

MILIORINI, A. B. *et al.* A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, 2011.

MOHER, D. *et al.* Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the prisma statement. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 62, n. 10, p. 1006-1012, 2009.

MUCHLISIN, Z. A.; AZIZAH, M. N. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 166-169, 2009.

MUCHLISIN, Z. A.; HASHIM, R.; CHONG, A. S. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa: the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 1/2, p. 25-34, 2004.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4 degrees C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Cryopreservation of sperm in brazilian migratory freshwater fish. *In*: YAMASHIRO, H. (ed.). **Recent advances in cryopreservation**. London: IntechOpen, 2014. cap. 4, p. 59-71.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Ultrastructural and morphometric analysis of gametes in Neotropical teleost fishes. **Journal of Fisheries Sciences**, Turkey, v. 11, n. 1, p. 56-61, 2017.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v.165, p.516-534, 2010.

NASCIMENTO, A. F. *et al.* Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, p. 324-329, 2010.

NASCIMENTO, A. F. *et al.* Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Bryconorbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 2, p. 103-110, 2012.

NEUMANN, G. *et al.* Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 201, p. 84-92, 2019.

NINHAUS-SILVEIRA, A. *et al.* Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in Matrinxa fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

NOGUEIRA, L. B. *et al.* Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 10, n. 1, p. 89-98, 2012.

NUNES, L. T. *et al.* Fertilizing capacity of the cryopreserved sperm of *Prochilodus brevis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 47, [art.] 1665, [p. 1-6], 2019.

NYNCA, J. *et al.* Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 477, p. 23-27, 2017.

ÖĞRETMEN, F. *et al.* Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Theriogenology**, New York, v. 83, n. 9, p. 1548-1552, 2015.

OLIVEIRA, M. S. *et al.* Cryopreservation of tambaqui semen using a dry shipper and a programmed freezing machine. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 2167-2180, 2016.

OLIVEIRA, A. V. *et al.* Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

ÓRFÃO, L. H. *et al.* Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 679-687, 2010.

ÓRFÃO, L. H. *et al.* Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1/4, p. 241-247, 2011.

PARDO-CARRASCO, S. *et al.* Cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish (*Sorubim cuspicaudus*) semen using dimethylacetamide. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Medellín, v. 10, n. 2, p. 122-131, 2015.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. *In*: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (ed.). **Methods in molecular biology**: cryopreservation and freeze-drying protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2007. v. 368, p. 39-58.

PEIXEBR. **Anuário PeixeBR da piscicultura**. São Paulo, PeixeBR, 2020.

PEÑA, F. J. *et al.* Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols. **Theriogenology**, New York, v. 76, n. 7, p. 1186-1193, 2011.

PEREIRA, J. R. *et al.* Dimethylsulfoxide, methanol and methylglycol in the seminal cryopreservation of Suruvi, *Steindachneridion scriptum*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 200, p. 7-13, 2019.

PERRY, C. T. *et al.* Amides as cryoprotectants for the freezing of *Brycon orbignyanus* sperm. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 508, p. 90-97, 2019.

POUPARD, G. P. *et al.* Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 110, n. 2, p. 315–327, 1997.

RAMIREZ-MERLANO, J. A.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Seminal cryopreservation of bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), under different protocols of freezing. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 43, n. 2, p. 135-144, 2011.

RAMIREZ-MERLANO, J. A. *et al.* Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 738-745, 2011.

RAMU, S.; JEYENDRAN, R. S. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *In*: CARRELL, D. T.; ASTON, K. I. (ed.). **Spermatogenesis**: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2013. p. 21–25.

REIS, R. E. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, London, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

RESTREPO-BETANCUR, G.; MONTOYA PÁEZ, J. D.; ARBOLEDA CHACÓN, L. Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de *Brycon henni* (Pisces: Characidae). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 28, n. 3, p. 597-605, 2017.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reprodução e embriogênese. *In*: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (ed.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: Universidade do Estado de São Paulo, 2014. p. 265-284.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporimus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, 2003.

RURANGWA, E. *et al.* The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, 2004.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. *et al.* Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, p. 255-268, 2012.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. *et al.* Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 8, n. 2, p. 343-350, 2014.

SANCHES, E. A. *et al.* Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 534-541, 2013.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do Ariacó *Lutjanus synagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 293-305, 2010.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n.12, p. 1673-1680, 2011.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, São Cristóvão, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J.; RIBEIRO, E. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Brasília, DF: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2017. (Texto para Discussão, n. 2328).

SHIMODA, E. *et al.* Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 315, p. 430-433, 2007.

SILVA, J. C. *et al.* The effects of osmolality on sperm quality in *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: Anablepidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 93-102, 2016.

SILVEIRA, W. F. *et al.* Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 51-54, 1988.

SOARES, F. A. C. *et al.* Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 17, p. 129–133, 2010.

STERNE, J. A. C.; EGGER, M.; SMITH, G. D. Investigating and dealing with publication and other biases. *In*: EGGER, M.; SMITH, G. D.; ALTMAN, D. G. (ed.). **Systematic reviews in health care: meta-analysis in context**. 2nd ed. London: BMJ, 2001. p. 189-208.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Motilidade, vigor e patologia seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, p. 159-167, 2009.

SUQUET, M. *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, p. 231–243, 2000.

TABARES, C. J.; TARAZONA, A. M.; ÁNGEL, M. O. Fisiología de la activación del espermatozoide em peces de agua dulce. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 18, n. 2, p. 149-161, 2005.

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**, Amsterdam, v. 105, n. 3/4, p. 283-91, 2008.

TIRELLI, M. *et al.* Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 28, n. 1, p. 17-33, 2005.

THOMPSON, S. G. Why and how sources of heterogeneity should be investigated. *In*: EGGER, M.; SMITH, G. D.; ALTMAN, D. G. (ed.). **Systematic reviews in health care: meta-analysis in context**. 2nd ed. London: BJM, 2001. p. 157-175.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology, London**, v. 9, p. 112–124, 2008.

VARELA JUNIOR, A. S. *et al.* Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 2, p. 244-51, 2012a.

VARELA JUNIOR, A. S. *et al.* Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 34, n. 2, p. 129-137, 2012b.

VARELA JUNIOR, A. S. *et al.* Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, p. 71-77, 2015a.

VARELA JUNIOR, A. S. *et al.* The role of dimethyl sulfoxide in the cryopreservation of Curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 5, p. 3471-3479, 2015b.

VASCONCELOS, A. C. N. *et al.* Cryopreservation of *Prochilodus lineatus* semen: effect of cryoprotectants combination. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, p. 817–824, 2015.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 52, p. 627-640, 1992.

VIVEIROS, A. T.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137-50, 2009.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Powder coconut water (ACP (R)) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. **Cybium**, Paris, v. 32, n. 2, p. 215-215, 2008.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009a.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, 2009b.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 41, p. 57-65, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 858-865, 2011.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, p. 546-555, 2012a.

VIVEIROS, A. T. *et al.* Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 4, p. 803-810, 2012b.

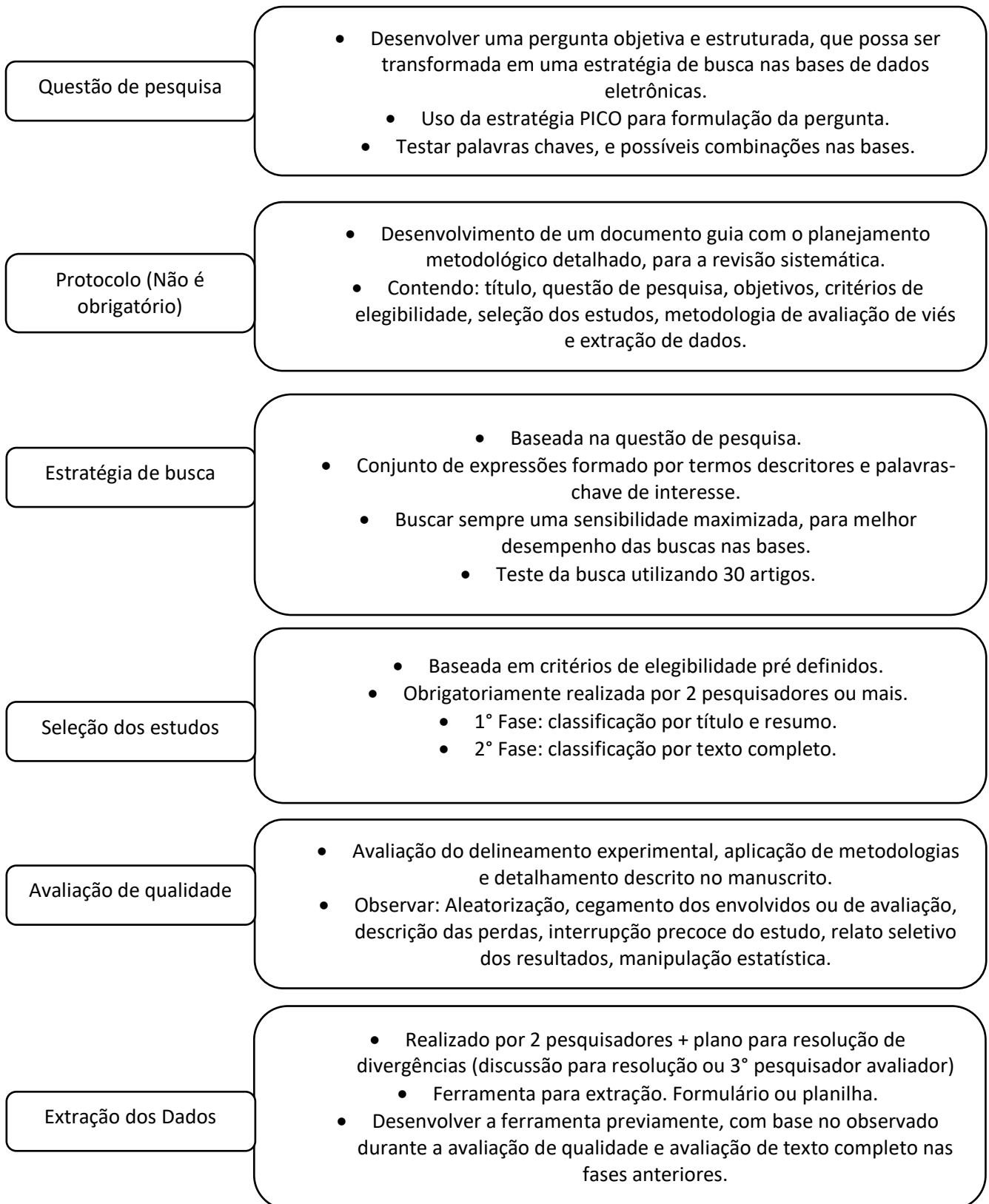
VIVEIROS, A. T. M.; ÓRFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e conservação de espermatozóides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (ed.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: Universidade do Estado de São Paulo, 2014. p. 307-327.

- VIVEIROS, A. T. M.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 12, n. 3, p. 643-648, 2014.
- VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 193-201, 2015a.
- VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Fresh, equilibrated and post-thaw sperm quality of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) treated with either salmon GnRHa and domperidone or pituitary extract. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 13, n. 1, p. 157-164, 2015b.
- VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M. C. Sperm dilution ratio affects post-thaw motility rate and velocity of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Zygote**, Ottawa, v. 24, n. 5, p. 662-7, 2016.
- VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Storage and transportation of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm prior to cryopreservation. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 84-88, 2017.
- VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Ions and osmolality on post-thaw sperm motility activation of the endangered *Brycon insignis* (Characiformes). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 35, n. 3, p. 739-746, 2019.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; CHOMPHUTHAWACH, S.; NIMRAT, S. Cryopreservation of red snapper *Lutjanus argentimaculatus* sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity. **Theriogenology**, New York, v. 72, p. 129-138, 2009.
- WEINGARTNER, M.; ZANANDREA, A. C. V.; ZANIBONI FILHO, E. Cryopreserved sperm for oocyte fertilization of dourado *Salminus brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 892-897, 2015.
- ZANIBONI-FILHO, E.; BALDISSEROTTO, B. Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 189-194, 2015.
- ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. *In*: CYRINO, J. E. P. *et al.* **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TechArt, 2004. p. 45-73.
- ZHANG, X. Effects of different cytoprotectants combination on sperm survival, fertility and embryo development in amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Animal and Veterinary Sciences**, New York, v. 6, n. 4, p. 51-57, 2018.
- ZHANG, T. *et al.* Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v. 50,

n. 3, p. 285-293, 2005.

Apêndice

APÊNDICE A – Roteiro para realização de Revisão sistemática e Meta-análise



Análise estatística

- Realização da meta-análise
- Apresentação dos dados em gráficos ou planilhas.
- Heterogeneidade baixa: análise por efeito fixo ou efeito randômico.
- Heterogeneidade alta: análise por subgrupos, meta-regressão (análise das causas da alta heterogeneidade)

Interpretação

- Interpretar o conjunto de dados e resultados obtidos.
- Levantar em consideração: heterogeneidade, efeito combinado, qualidade das evidências, risco de vieses.

Redação do artigo

- Formular a resposta para a pergunta inicial, as evidências á respondem ou não? Se sim, encerra o problema, se não orienta novos estudos,
 - Escrever o artigo.

Anexos

ANEXO A – Guia para autores Reviews in Fisheries Science & Aquaculture.

About the Journal

Reviews in Fisheries Science & Aquaculture is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Reviews in Fisheries Science & Aquaculture accepts the following types of article: original articles.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where “a quotation is ‘within’ a quotation”. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word format. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

Author details. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCIDiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).

Should contain an unstructured abstract of 200 words.

You can opt to include a video abstract with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).

Between 3 and 6 keywords. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.

Funding details. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

For single agency grants

This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].

For multiple agency grants

This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].

Disclosure statement. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).

Data availability statement. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.

Data deposition. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.

Supplemental online material. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).

Figures. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for color, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PDF, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.

Color figures. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* publishes color figures in color both online and in print at no charge to authors.

Tables. Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

Equations. If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).

Units. Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Center](#), where you will find user guides and a helpdesk.

Please note that *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal. Also note that *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* publishes color figures color both online and in print free of charge.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements](#).

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact Taylor & Francis at reprints@taylorandfrancis.com. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

Queries

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).

ANEXO B – Guia para autores *Theriogenology*

GUIDE FOR AUTHORS

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

It is recommended that the manuscript should be submitted in Word document

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. *Elsevier supports responsible sharing* Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career

researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/therio/default.asp>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered 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. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **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 lowercase 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.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

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

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

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 finalized, 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.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

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. Keypoint in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

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

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.

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.

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.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

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).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

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. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your 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).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life

- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods): theriochart.jpgchart

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μL - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year

Routes of treatment

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the *CBE Manual* or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

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. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. 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

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.

VITA

Paula Graziela Lassen, nascida no dia 28 de outubro de 1987, na cidade de Ijuí, filha de Hervê Edebrando Lassen e Rosa Maria Dezordi Lassen. Coursou ensino fundamental e médio no Colégio Estadual de Primeiro e Segundo Graus Antônio Mastella, em Jóia, concluindo seus estudos em 2004. Ingressou no curso de Agronomia, da Universidade Regional do Noroeste do Estado – Unijuí no ano de 2005, interrompendo o curso em 2007 para ingressar no curso de Zootecnia, na Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, onde estagiou nas áreas de nutrição de ruminantes, produção avícola e desenvolvimento de máquinas agrícolas, vindo a graduar em Janeiro de 2012. No mesmo ano ingressou no Programa Especial de Graduação para a Formação de Professores para a Educação Profissional, recebendo o Diploma de licenciatura no ano de 2013. Trabalhou como professora, na rede estadual do Rio Grande do Sul, ministrando as disciplinas de Bovinocultura, Avicultura e Legislação Rural, no ano letivo correspondente á 2013. Mestre em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2016), ingressou em Abril de 2016 no curso de Doutorado em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

