

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

DIOGO RODRIGUES ARAÚJO

**A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) NÃO
INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DA PROLE**

Porto Alegre

2023

DIOGO RODRIGUES ARAÚJO

**A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) NÃO
INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DA PROLE**

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

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Coorientador: Rômulo B. Rodrigues

Porto Alegre - RS

Março, 2023

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues Araújo, Diogo
A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ (Rhamdia
quelen) NÃO INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DA PROLE /
Diogo Rodrigues Araújo. -- 2023.
53 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Júnior.

Coorientador: Romulo Batista Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.
1. criopreservação. 2. comportamento. 3. sêmen . 4.
jundiá . I. Pedro Streit Júnior, Danilo, orient. II.
Batista Rodrigues, Romulo, coorient. III. Título.

Diogo Rodrigues Araújo
Biólogo

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

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

Aprovada em: 28.03.2023
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 07/06/2023
Por

Documento assinado digitalmente
gov.br **DANILO PEDRO STREIT JR**
Data: 29/04/2023 09:46:36-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

DANILO PEDRO STREIT JUNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Documento assinado digitalmente
gov.br **LIS SANTOS MARQUES**
Data: 04/05/2023 13:26:48-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Lis Santos Marques
PUCRS

Gessi Assinado de forma digital por
Gessi
Data: 2023.05.04 08:08:41
-0300'

Gessi Koakoski
UPF

**KESIANE
MAYRA DA
COSTA** Assinado de forma
digital por KESIANE
MAYRA DA COSTA
Data: 2023.06.27
19:28:33 -0300'

Kesiane Mayra da Costa
SEPAME

Sergio Luiz Vieira Assinado de forma digital por
Sergio Luiz Vieira
Dados: 2023.06.14 11:07:28 -0300'

Sergio Luiz Vieira
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Documento assinado digitalmente
gov.br **CARLOS ALBERTO BISSANI**
Data: 16/06/2023 15:14:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

Agradecimentos

Expresso minha gratidão ao meu coorientador, Rômulo Rodrigues Batista, por sua paciência e ajuda ao longo desses dois anos. Também sou grato à equipe do nosso grupo de pesquisa - Thaiza Rodrigues, Nathalia Teixeira, Renata Villar, Raquel Barbosa, Itamar Cosina, Johny Benatto, Thales Flores e Thales Fabris - que foram fundamentais durante todo o período de experimentos. Essas pessoas me ensinaram o verdadeiro significado de trabalho em equipe e o valor de um grupo de pesquisa, onde cada um desempenhou um papel importante em meus experimentos, sem o qual eu não teria conseguido. Gostaria de agradecer à minha amiga e colega de faculdade, Amanda Bungi, que com sua experiência, me ajudou a colocar em prática meus experimentos comportamentais.

Não posso deixar de mencionar a importância do apoio da minha família, Vladimir, Elieta e Lenon, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as decisões que tomei até hoje.

Por último, mas sem ele nada disso teria acontecido, sou grato ao meu orientador, Danilo Streit, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa e por me permitir essa oportunidade desafiadora. Muito Obrigado.

A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) NÃO INFLUENCIA O COMPORTAMENTO DA PROLE¹

Autor: Diogo Rodrigues Araújo
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.
Coorientador: Rômulo B. Batista

A criopreservação é utilizada para preservação de material genético, porém, essa técnica pode causar danos permanentes nas gerações futuras, alterando seu desenvolvimento e comportamento. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da criopreservação sobre o comportamento da prole de jundiá (*Rhamdia quelen*) em dois estágios de desenvolvimento. O comportamento normal é um fator crucial para a sobrevivência dos peixes, pois isso permite a capacidade de defesa ou fuga, busca por alimento e reprodução. Utilizamos 19 machos, para a coleta seminal e formação de um pool de sêmen e quatro fêmeas para coleta de oócitos e fertilização in vitro. O pool do sêmen (N=19) foi dividido em dois grupos, o controle (fresco) e o criopreservado. Para a criopreservação, foi utilizado uma solução crioprotetora composta por leite em pó desnatado (50g/L), metanol (100ml/L) e frutose (50g/L). As amostras foram envazadas em palhetas (250µL), que foram resfriadas em vapor de nitrogênio líquido e transferidas para o botijão. O descongelamento foi feito em banho maria 25°C por 10 s e utilizado para a fertilização. Um total de quatro fêmeas foram coletadas para formar um pool de oócitos. A integridade de membrana ($p=0,0839$), a taxa de fertilização ($p=0,2403$) e a eclosão ($p=0,1769$), bem como a morfologia das larvas ($p>0,9999$) foram analisadas. O comportamento das larvas e juvenis foram avaliados e nenhum dos testes apresentou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Portanto, é possível concluir que a criopreservação não afetou o comportamento esperado da espécie, validando o protocolo para *R. quelen*.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*; comportamento; criopreservação; prole.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2023.

The cryopreservation of jundiá (*Rhamdia quelen*) semen does not influence offspring behavior

Author: Diogo Rodrigues Araújo
Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.
Co-advisor: Rômulo B. Batista

Sperm cryopreservation is used to preserve genetic material, however, this technique may cause serious damage that can be carried to future generations, altering its development and behavior.

The aim of this work was to evaluate the effects of cryopreservation on the behavior of the offspring of Jundiá (*R. quelen*) in two developing stages. Behavior is a crucial factor for the survival of the animals. The capability of defense or escape, search for food and breeding are important and any changes can put at risk the protocol developed. For the seminal harvesting and the formation of a sperm pool, 19 males were used, for the harvesting of oocytes and in vitro fertilization, 4 females were used. The semen pool were divided in two groups, the control group (fresh) and the cryopreserved group. For the cryopreservation, a cryoprotectant solution was used, composed of skim milk powder (50g/L), methanol (100ml/L) and fructose (50g/L). The semen was packed in straws (250 μ L), which were cooled in liquid nitrogen vapor and were transferred to the nitrogen cylinder. For the defrosting, the straws were heated in a water bath 25 $^{\circ}$ c for 10s and utilized for fertilization. The membrane integrity ($p=0,0839$), fertilization rate ($p=0,2403$), percentage of hatch ($p=0,1769$) and morphology ($p>0,9999$) was determined. The behavior of larvae and juveniles was evaluated, and all tests showed no statistical difference between the groups ($p > 0,05$), concluding that cryopreservation did not affect to the point of causing behavioral changes, validating the protocol for the specie.

Keywords: *Rhamdia quelen*; behaviour; cryopreservation; offspring.

1 Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. March, 2023.

Lista de figuras

Figura 1. Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen* adulto.

Figura 2. Aparato de análise comportamental de larvas. Filmado por cima.

Figura 3. Aparato para analisar a atividade do animal em um tanque novo, aquário medindo 15x30x18cm e filmado pela lateral.

Figura 4. Aparato de análise de interação social com aquários medindo 13x30x18cm, sendo A um aquário apenas com água, B onde fica o animal a ser analisado e C com um pequeno cardume de jundiá. Filmado pela lateral.

Figura 5. Aquário de avaliação de agressividade com aquário medindo 15x30x18cm com espelho angulado em 22,5 graus. Filmado de cima.

Figura 6. Aparato de teste de preferência de claro ou escuro, medindo 15x30x18 com compartimento revestido na cor preta e compartimento em revestimento branco. Filmado de cima.

Figura 7. Análise de motilidade e cinética espermática por meio do CASA - Computer-assisted sperm Analysis. As variáveis Motilidade (A), VCL (B), VSL (C) e WOB (F), foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis VAP (D), STR (E), PROG (G) e BCF (H), foram analisadas pelo teste T-Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Fresh (n=19); Cryo (n=9).

Figura 8. Integridade de membrana e capacidade fecundante do sêmen de jundiá fresco e criopreservado. As variáveis Integridade de membrana (A) (n=15) e Taxa de eclosão (C) (n=6), foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis de taxa de fertilização (B) (n=6), e % de larvas normais (D) (n=6), foram analisadas pelo teste T-Student.

Figura 9. . Comportamento de larvas de jundiá provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), considerando os efeitos dos grupos experimentais (criopreservado e fresco), do tempo (idade dos animais) e a interação. Letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa entre as idades dos animais, dentro do mesmo grupo experimental, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). n=4.

Figura 10. Avaliação da locomoção de animais provenientes de sêmen fresco e criopreservado. As variáveis distância percorrida (A) e zona superior (C), foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis de tempo móvel (B), e zona inferior (D), foram analisadas pelo teste T-Student. n=4.

Figura 11. Avaliação da interação social de animais provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Dados analisados pelo teste T-Student. n=4.

Figura 12. Avaliação da agressividade de animais provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Variáveis foram analisadas pelo teste T-Student.

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPE – extrato de pituitária de carpa

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

CV – Coeficiente de variação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

cm – centímetro(s)

mg- miligrama(s)

mg/L - miligrama por litro

min - minutos

ROS - reactive oxygen species

µL – microlitro

VCL- Velocities curvilinear

VAP- average path

VSL- straight-line

STR- straightness

s - segundos

WOB- wobble

BCF- Beat Cross Frequency

% - Porcentagem

R. Quelen – Rhamdia quelen

RNA – Ácido Ribonucleico

Sumário

Sumário

1. Introdução	9
2. Hipótese e objetivos	10
3. Revisão Bibliográfica	11
3.1 Criopreservação	11
3.2 Criopreservação de sêmen	12
3.3 Comportamento animal	16
3.4 O jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	19
4. Material e métodos	21
4.1 Indução hormonal e criopreservação seminal	22
4.2 Avaliação de qualidade do sêmen	23
4.3 Fertilização	24
4.5 Avaliações comportamentais	25
4.5.1 Avaliação comportamental da prole com 5, 10, 15 e 20 dias após eclosão	25
4.6 Avaliação comportamental dos juvenis com 90 dias de idade	26
4.6.1 Teste do tanque novo (Avaliação da locomoção)	26
4.6.2 Interação social	27
4.6.3 Avaliação de agressividade	28
4.6.4 Teste claro/escuro	30
4.7. Análise estatística	31
5 Resultados	31
5.1 Qualidade seminal	31
5.1.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)	31
5.1.2 Integridade de membrana, taxa de fertilização, eclosão e larvas normais e anormais	33
5.2 Comportamento da prole	34
5.2.1 Comportamento larval	34
5.2.2 Comportamento de juvenis 90 dpf	36
5.2.2.1 Locomoção	36
5.2.2.2 Interação Social	37
5.2.2.3 Agressividade	37
5.2.2.4 Claro/escuro	38
6. Discussão	38

7. Conclusão	42
8. Considerações finais	42
9. Referências:	44
10. Vita	52

1. Introdução

A expansão da aquicultura, juntamente com a necessidade de proteção de espécies ameaçadas, tem impulsionado o interesse na conservação dos recursos genéticos de peixes (DE CARVALHO et al., 2014). A criopreservação se baseia na preservação da viabilidade das células ou tecidos armazenados em temperaturas muito baixas, inibindo reações enzimáticas e permitindo que a atividade metabólica seja restaurada normalmente após o aquecimento do tecido (MAZUR et al., 1984). Nesse sentido, a criopreservação permite a manutenção da diversidade de espécies e a gestão de peixes que são modelos experimentais em áreas como a biomedicina e a aquicultura (TSAI et al., 2010).

Pela importância da criopreservação na preservação dos recursos genéticos, diversos protocolos de criopreservação são continuamente pesquisados e aprimorados, pois o processo de congelamento pode causar danos às células devido a fatores como flutuação do pH, choque térmico, formação de cristais de gelo, diferença de osmolaridade e toxicidade dos crioprotetores (CHAO & LIAO., 2001). Embora os crioprotetores sejam usados para proteger as células e tecidos durante a diminuição da temperatura, eles também podem causar danos osmóticos e de toxicidade (GUAN et al., 2010). De Mello et al. (2017) observaram alterações significativas nos padrões de metilação do DNA em espermatozoides causadas pelo uso de crioprotetores, e o uso dessas amostras na fertilização prejudicou o desenvolvimento embrionário e a viabilidade da prole. Estudos recentes em mamíferos mostram que o sêmen com DNA danificado ou regulação anormal do DNA tem a capacidade de fecundar um oócito, mas os embriões gerados podem ser afetados negativamente no seu desenvolvimento (EMERY & CARRELL, 2006). Os eventos mutacionais ou danos ao DNA têm o potencial de induzir marcas epigenéticas hereditárias (JABLONKA & RAZ, 2009), que podem ser responsáveis por mudanças comportamentais na prole (CURLEY et al., 2011). Em estudo realizado por García-Palomares et al. (2009), observou-se que a paternidade tardia em ratos causou alterações comportamentais na prole, prejudicando o desenvolvimento dos animais, a atividade motora espontânea e

a capacidade de aprendizagem de evasão passiva. Os padrões de metilação dos embriões são herdados em grande quantidade do macho, ou seja, dos espermatozoides, isso para que o padrão de metilação do DNA materno possa ser mantido até o estágio de 16 células em *zebrafish*. Esse padrão é gradualmente reprogramado para um padrão semelhante ao da metilação dos espermatozoides (JIANG et al., 2013).

Embora haja muitos estudos que avaliam os efeitos da criopreservação sobre diversos parâmetros de qualidade do sêmen, tais como motilidade, integridade da membrana, estresse oxidativo e capacidade de fertilização, não há estudos até onde investigamos que avaliem o comportamento da prole resultante de um processo de criopreservação.

Sabendo-se da importância que o comportamento normal do animal tem sobre a sua sobrevivência e seu bem-estar na natureza e em cativeiro, e que o comportamento é influenciado por fatores genéticos e ambientais, estudos avaliando o padrão comportamental de animais provenientes de criopreservação se fazem necessários. Com isso, nosso trabalho buscou identificar alterações comportamentais em Jundiá (*Rhamdia quelen*), outro animal que vem surgindo como modelo para diversos estudos de fisiologia e mais recentemente estudos comportamentais, baseados em protocolos de comportamentos utilizados para *zebrafish* (ABREU et al., 2016).

2. Hipótese e objetivos

Como hipótese do nosso trabalho, queremos avaliar se os efeitos causados pelo processo de criopreservação no sêmen podem levar a alterações na qualidade dos espermatozoides após o congelamento/descongelamento, podendo prejudicar a fertilização, o desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento normal e saudável da prole, levando a alterações comportamentais.

Nosso objetivo geral foi avaliar os efeitos da criopreservação sobre o comportamento da prole de jundiá. Os objetivos específicos foram a avaliar a

qualidade do sêmen de jundiá antes e após o processo de criopreservação, avaliar os parâmetros de sucesso reprodutivo (fertilização, eclosão e desenvolvimento normal da prole) e analisar variáveis comportamentais em dois estágios de desenvolvimento do jundiá.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Criopreservação

A criopreservação é uma ferramenta para a manutenção e preservação de material genético, sendo importante para a preservação de espécies e manutenção de patrimônio genético e para a pesquisa (TSAI et al., 2010). O objetivo desta técnica é paralisar a atividade celular evitando o envelhecimento e morte celular (MAZUR et al., 1984).

A velocidade de resfriamento ideal no congelamento deve ser a mais rápida possível para evitar os efeitos nocivos da solução crioprotetora, mas ainda lenta o suficiente para permitir que as células desidratam o suficiente e evitem a formação de gelo intracelular (MAZUR et al., 1984). Na criopreservação, soluções crioprotetoras permeáveis são usadas para substituir a água intracelular, aumentando a permeabilidade da membrana e desidratando parcialmente a célula. Isso reduz o limiar de congelamento e evita a formação de cristais de gelo no interior das células (ROSATO & IAFFALDANO, 2013). Os crioprotetores podem ser divididos em grandes dois grupos: permeáveis (internos) e não permeáveis (externos). Os crioprotetores permeáveis, que podem penetrar nas células, devem ter baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta capacidade de atravessar a membrana celular (FAHY et al., 2010) para que possam realizar seu papel de proteger a célula internamente. Os crioprotetores não permeáveis, que têm alto peso molecular e não conseguem penetrar nas células, atuam externamente. Eles se ligam às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução e diminuindo a formação de cristais de gelo, já que são hidrofílicos (FAHY, 2007).

Em resumo, a criopreservação é uma técnica com muitos desafios a serem superados, com o potencial de revolucionar muitas áreas da conservação da biodiversidade, produção, pesquisa científica e na medicina, como em transplante de órgãos e a terapia celular. A continuação de pesquisas e desenvolvimentos nessa área pode trazer benefícios significativos para o meio ambiente e saúde humana.

3.2 Criopreservação de sêmen

Em 1953, houve o primeiro êxito na criopreservação de sêmen de peixes, com o sêmen de arenque (BLAXTER, 1953). Atualmente, a criopreservação seminal de peixes é realizada com sucesso e há criobancos em operação em diversos países, tais como: o Programa Nacional de Germoplasma de Animais nos Estados Unidos; o Criobanco da Academia Nacional de Ciências na Ucrânia; o CryoAqua na França; o EZRC na Alemanha; o RIFCH Bank na República Tcheca (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017), e o ZIRC, que possui a maior coleção biomédica nos EUA, armazenando milhares de linhagens de zebrafish (MATTHEWS et al., 2012).

É possível descrever algumas etapas básicas da criopreservação seminal de peixes, como a obtenção do sêmen, a diluição, o armazenamento refrigerado, o congelamento, o armazenamento congelado, o descongelamento, a utilização da amostra para fertilização e a avaliação da qualidade seminal (TIERSCH, 2001). O congelamento pode ser realizado de diversas maneiras, como por exemplo, com a utilização de gelo seco, suspensão em vapor de nitrogênio ou refrigeração controlada com congelador programável (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2017). As duas primeiras opções são mais econômicas e práticas, podendo ser utilizadas em coletas de campo e em laboratórios menos equipados, o que torna o processo mais acessível. Já o uso de congelador programável é indicado para obtenção de taxa de resfriamento precisa e padronizadas, no entanto, essa tecnologia não está disponível em todos os laboratórios, e seu uso em coletas de campo é limitado.

De acordo com CABRITA et al. (2010), a criopreservação seminal traz diversos benefícios, como o armazenamento para uso posterior, a utilização do volume total do sêmen disponível, especialmente útil quando o sêmen é difícil de obter, a simplificação da manutenção da criação de descendentes, o transporte de gametas para diferentes fazendas evitando o transporte de animais, e a manutenção das características desejadas dos animais. Os espermatozoides de peixes de água doce são imóveis dentro do trato reprodutivo, sendo ativados somente quando liberados no ambiente aquoso hipotônico durante a reprodução (ALAVI & COSSON, 2006). Dessa forma, a motilidade pode ser iniciada e interrompida por ajustes na osmolaridade do diluente utilizado. Para a maioria dos peixes de água doce, a motilidade espermática tem duração baixa, com cerca de 1 a 2 minutos (BILLARD & COSSON, 1992).

A mobilidade espermática pode ser iniciada em soluções com menor concentração de solutos (JING et al., 2009), assim ocorre no sêmen do jundiá. Dessa maneira, soluções diluentes devem ser preparadas com uma osmolaridade maior que o valor de ativação dos espermatozoides, para evitar uma ativação prematura da mobilidade, o que pode levar à perda de viabilidade. Vários extensores e crioprotetores foram utilizados para a criopreservação de sêmen em diferentes espécies de peixes. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi considerado o crioprotetor mais eficiente para a maioria das espécies (SUQUET et al. 2000). Vários aspectos do processo de criopreservação podem afetar a qualidade dos espermatozoides após o descongelamento e a frequência de danos no material. Dentre os aspectos, podemos citar a velocidade de congelamento e descongelamento, o tipo de recipiente utilizado para o armazenamento, a incorporação da solução crioprotetora e a quantidade de crioprotetor na solução. Os resultados após o descongelamento são influenciados por diversos fatores, como a toxicidade da solução, o estresse osmótico e a formação de gelo extra e intracelular durante os processos de congelamento e descongelamento (GAO & CRITSER, 2000), que podem afetar de forma direta a motilidade dos espermatozoides, a avaliação destes parâmetros cinéticos é importante para entender a qualidade dos espermatozoides e sua capacidade de fertilização. Estes parâmetros fornecem

informações sobre a motilidade, a velocidade e a duração da atividade espermática, o que pode indicar a eficácia dos espermatozoides em fertilizar oócitos e produzir descendentes saudáveis. Além disso, a avaliação dos parâmetros cinéticos pode ajudar a identificar possíveis problemas de saúde ou ambientais que possam afetar a qualidade do sêmen, e, portanto, a reprodução bem-sucedida de uma espécie. Os parâmetros de motilidade espermática nos indicam a capacidade dos espermatozoides de se moverem de forma eficiente e direcionada, é um importante indicador da qualidade do sêmen e de sucesso reprodutivo. Quando a motilidade espermática é alta, isso indica que os espermatozoides são capazes de nadar de forma coordenada em direção ao oócito, aumentando as chances de fertilização e, conseqüentemente, a produção de descendentes saudáveis. Por esses motivos, a avaliação e o monitoramento da motilidade espermática em peixes são fundamentais em programas de reprodução em cativeiro e conservação de espécies, que, apesar de a criopreservação ser um processo tóxico para a célula, é importante que não seja tóxico o suficiente para inviabilizar o sucesso reprodutivo. A criopreservação é uma importante ferramenta na área de produção e conservação, é importante que se leve em consideração os padrões de qualquer alteração que possa causar, a validação de qualquer protocolo desenvolvido sempre deve comparar os valores do sêmen fresco com o congelado, assim podemos avaliar a toxicidade do protocolo de criopreservação executado sobre as células de interesse, e, conseqüentemente sobre a prole obtida.

Embora seja uma técnica bem estabelecida para a preservação do sêmen de peixes, alterações nos protocolos são necessárias para cada espécie de interesse. O impacto do uso da criopreservação na produção aquícola é bem conhecido, mas a técnica também é usada para pesquisa na área médica, contribuindo para a formação de bancos de linhagens transgênicas de interesse específico, como linhagens que mimetizam doenças humanas. Os aprimoramentos de protocolos e análises de qualidade celular ainda são necessários, visto que novos componentes podem ser melhorados e adaptados de acordo com a realidade local e a diferenciação interespecífica. Uma das maiores preocupações são os danos genéticos que a criopreservação pode causar nas células e conseqüentemente ser passado de geração para geração

(FÉRNANDEZ-GONZALES et al., 2008), o que pode estar inteiramente relacionado a alterações comportamentais, de acordo com alterações fisiológicas que podem ocorrer na prole.

Existem várias oportunidades de melhoria nos protocolos para aumentar a resistência das células durante o processo, como a adição de compostos como vitaminas, aminoácidos e lipídios, o uso de melhores diluentes e o ajuste dos tempos de equilíbrio desses compostos. O tempo de equilíbrio é outro fator importante no processo de criopreservação, pois é quando a célula recebe sua proteção contra a formação de cristais de gelo, flutuação de pH, estresse oxidativo, estresse osmótico e tem sua integridade funcional menos afetada (CABRITA et al., 2010).

Assim como ocorre em muitas espécies nativas, a reprodução artificial pode ser aprimorada por meio da indução hormonal, que pode auxiliar os animais a atingir a maturidade dos gametas e produção mais eficiente, tornando o manejo reprodutivo mais eficaz. Quando combinada com a criopreservação de sêmen, a indução hormonal pode reduzir o número de reprodutores necessários e ser altamente eficaz em programas de reprodução. Além disso, a criopreservação de sêmen em bancos de germoplasma pode contribuir significativamente para a preservação da biodiversidade. No entanto, em alguns peixes neotropicais, ainda há muitas dificuldades relacionadas aos protocolos e técnicas utilizados para a criopreservação de sêmen. Muitos desses peixes não podem ser criopreservados em recipientes de tamanho maior que possam manter uma quantidade viável de espermatozoides para a fertilização em larga escala. (CABRITA et al., 2001).

Ainda que a criopreservação esteja bem estabelecida com relativo sucesso em grande parte dos peixes de clima temperado (CABRITA et al., 2010), há perda de viabilidade espermática causada pelas crioinjúrias (LI et al., 2006), o método ainda precisa de atualizações e novos protocolos a cada necessidade, para que como dito, possa ser utilizado em uma escala maior. Os danos causados nas células podem estar associados a vários fatores, como rompimento da membrana celular, permeabilidade, formação de cristais de gelo e redução das atividades enzimáticas (THUNDATIL et al., 1999), o que pode ser

reduzido combinando diferentes crioprotetores, curvas de resfriamento e de descongelamento.

A criopreservação de sêmen de peixes é uma técnica que tem um impacto significativo na produção e conservação das espécies e pode ser aplicada em programas de melhoramento e repovoamento de áreas naturais, além da preservação do material genético.

3.3 Comportamento animal

Os estudos comportamentais das espécies de peixes são significativos por várias razões. Eles possibilitam uma compreensão mais aprofundada da biologia e ecologia dessas espécies, o que é crucial para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação dos peixes e seus habitats. Adicionalmente, esses estudos podem fornecer informações relevantes para melhorar as técnicas de cultivo (COSTENARO-FERREIRA, 2016). Além disso, a análise comportamental dos peixes pode ter implicações em outras áreas, como a saúde pública e a ecologia geral dos ecossistemas aquáticos.

O bem-estar animal é uma questão que abrange diversas áreas científicas. A disciplina que se aproxima mais da análise do bem-estar animal é a etologia, que tem como objetivo compreender o comportamento dos animais. Nos primeiros estudos da etologia, o primeiro livro publicado sobre comportamento animal (HAFEZ, 1962) continha mais de 600 páginas com informações sobre diversas espécies. Desde então, a ciência evoluiu e aprimorou seus métodos, tornando-se uma disciplina baseada em uma vasta gama de conhecimentos, que vão desde os estágios iniciais de vida dos animais até sua interação social, aprendizado, reprodução e comportamentos não convencionais, como rituais fúnebres, caçadas e elaboradas estratégias alimentares (GONYOU, 1994).

Conforme mencionei anteriormente, muitos estudos iniciais sobre comportamento animal enfatizavam informações relacionadas a animais de produção ou que estavam de alguma forma fora do seu ambiente natural,

focando principalmente em seu bem-estar. No entanto, há um interesse crescente em compreender como os animais se comportam em seu ambiente natural. Por isso, diversas técnicas de biomonitoramento têm sido desenvolvidas para coletar dados importantes sobre a atividade animal, procurando reduzir a interferência humana sempre que possível. Um exemplo desse tipo de estudo é o trabalho realizado por Schulz e Leuchtenberger, que implantaram transmissores de localização em jundiás para acompanhar seu comportamento em seu ambiente natural (SCHULZ & LEUCHTENBERGER, 2006).

Durante o século XX, a etologia e a psicologia animal se desenvolveram independentemente uma da outra. A etologia se concentrava no estudo do comportamento inato e em como ele se relacionava com a teoria da evolução, enquanto a psicologia animal se dedicava ao estudo do pensamento e do aprendizado dos animais, explorando a evolução do pensamento. Atualmente, no entanto, essas áreas se complementam e se integram em um campo mais amplo de estudo do comportamento animal (SHETTLEWORTH, 2001), assim como a fisiologia que hoje está cada vez mais ligada ao estudo comportamental, visto que muitos modelos animais apresentam padrões de comportamento facilmente manipuláveis em laboratório, um grande exemplo é o uso do *zebrafish* (*Danio rerio*) na pesquisa nas mais diversas linhas (CHOI et al., 2021).

Alguns estudos dizem que mudanças no comportamento de jundiá são descritos de forma observacional e descritiva, sem mensuração de parâmetros que possam ser comparados estatisticamente, sendo a experiência, e percepções de quem está avaliando os testes de bastante importância, como por exemplo a agitação quando é fornecido alimento, observação de canibalismo, padrão de natação e preferência por abrigos. Entretanto, já é visto que animais juvenis apresentam comportamento semelhante ao *zebrafish* adulto. Ainda assim, o jundiá é um animal bastante diferente do *zebrafish*, que é um animal diurno, com comportamento social mais presente e preferência por nadar na superfície da água, enquanto o jundiá é um animal que tem hábitos noturnos, sem comportamento de grandes cardumes (social) e são animais bentônicos, preferindo viver abrigados entre pedras e troncos (ABREU et al., 2016; GOMES et al., 2000). Ainda assim, são animais que respondem a testes comportamentais padronizados para *zebrafish* como resposta social e teste de

tanque novo, o que permite que possam ser avaliados em softwares padronizados para *zebrafish*. Neste trabalho realizamos mais dois testes comportamentais, o de preferência por ambiente claro ou escuro e a resposta agressiva, testes também padronizados para *zebrafish* e analisados pelo mesmo *software*.

Outro comportamento bastante observado é o canibalismo, uma das principais causas de perdas nas criações de jundiá, especialmente nos primeiros estágios de vida das larvas que é uma característica muito marcante na espécie, e que também apresenta comportamento extremamente territorialista, o que pode ocasionar a diminuição da sobrevivência dentro de cultivos (BARCELLOS et al, 2000). Em nosso estudo, observamos a presença deste comportamento também característico da espécie. Isso indica seu fator evolutivo, com animais menores servindo de alimento para animais maiores com mais chances de sobrevivência e sucesso reprodutivo (COSTENARO-FERREIRA, 2016).

É importante destacar que o viés do observador é um fator que deve ser considerado no estudo comportamental, muitos pesquisadores podem deixar que seu conhecimento técnico sobre as espécies e os efeitos dos tratamentos influenciam os resultados, principalmente em experimentos que envolvam observação direta do animal sem o uso de softwares ou equipamentos automáticos imparciais. De fato, estudos indicam que nossos sentidos nem sempre representam com precisão a realidade, e há evidências de que o cérebro humano pode ter tendências, mesmo que inconscientes, a fazer deduções e associações incorretas (BRAECKMAN & BOUDRY, 2011).

A expectativa pode ser um grande risco nos experimentos comportamentais, especialmente aqueles que envolvem a observação do jundiá. Para aumentar a confiabilidade dos nossos experimentos, incorporamos ao estudo do jundiá o vasto conhecimento sobre os comportamentos padronizados para *zebrafish*, permitindo uma quantificação e registro automatizados das atividades do jundiá, sem depender exclusivamente da observação humana. Estudos de meta-análise têm demonstrado que a presença de observadores não neutros pode afetar significativamente os efeitos e as observações de um experimento (HRÓBJARTSSON et al., 2013; SCHULZ et al, 1995). Portanto, é de grande importância padronizar as observações e usar métodos

automatizados e neutros (TUYTTENS et al., 2014), como em experimentos filmados e analisados por software específico *EthovisionXP*.

O comportamento, atividade com diversos mecanismos e vias, é um fator de grande importância para a sobrevivência e desenvolvimento do animal. Quando falamos em comportamento inicial de uma prole, sabemos que é uma ferramenta valiosa para entender sua ecologia e ontogenia. Estudar seu comportamento pode ajudar a identificar fatores que afetam a sobrevivência, preferência por tipos de habitat ou alimento, fuga de predadores ou capacidade de se adaptar às mudanças do ambiente. Estudo comportamental dos animais é importante para a piscicultura, pois ajuda a melhorar as práticas de cultivo e aumentar a produção de peixes. Um exemplo disso foi visto no estudo de RIFFEL et al. (2012), que mostrou a preferência do jundiá em relação ao pH dos tanques através de seu comportamento.

3.4 O jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE), é um peixe de distribuição neotropical encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México (GOMES et al, 2000). É uma espécie de peixe nativa bastante produzida na região Sul do Brasil (HILTON, 2015) , com mais de 20 mil estabelecimentos agropecuários criadores de jundiá, segundo o Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2020, pois apresenta além das características de adaptabilidade aos sistemas de cultivo, grande resistência aos períodos de frio, rápido crescimento, rusticidade ao manejo e fácil adaptação à alimentação artificial.

O jundiá é um animal que vive em lagos e rios, preferindo sempre águas mais calmas com fundo de areia e lama, perto das margens e da vegetação. Gostam de se abrigar entre pedras e troncos, e saem à noite para se alimentarem (GUEDES 1980). Em estudos com larvas e juvenis dessa espécie em cativeiro, mostram que estes animais têm uma certa aversão a ambientes claros, sempre preferindo locais mais escuros (PIAIA et al., 1999).

A cor do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza. A pigmentação da parte inferior da cabeça é bastante alternada, os barbilhões ou

bigodes têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (SILFVERGRIP 1996). Segundo o mesmo autor, o jundiá pode ser diferenciado das outras espécies de *Rhamdia* por causa de diversas características que são bastante particulares, como, coloração e a conformação óssea.

Estes animais atingem sua maturidade sexual por volta de um ano de idade, nos dois sexos (GOMES et al., 2000), apesar de observações em nosso laboratório mostrar que os machos já estão aptos a coleta de sêmen e reprodução com cerca de seis meses de idade. A partir de 16,5 cm e 17,5 cm, todos os espécimes machos e fêmeas, estão potencialmente prontos para reproduzirem (NARAHARA et al., 1985). Machos prontos liberam facilmente o líquido espermático quando o abdômen é massageado/pressionado e as fêmeas aptas e induzidas hormonalmente também liberam seus oócitos quando pressionado o abdômen.

O jundiá é uma espécie ovulípara no habitat natural e, quando prontos para desova, cardumes procuram lugares de água mais rasa, clara, pouca correnteza e com fundo pedregoso onde depositam seus ovos. A espécie não possui cuidado parental. (MARDINI et al., 1981), característica comum em espécies migradoras. O jundiá é um animal que responde bem à indução hormonal (NASCIMENTO et al., 2016; SANCHES et al., 2013) desta forma, a espécie tem um grande potencial para reprodução artificial para produção para consumo e pesquisa.

Por ser uma espécie adequada para a aquicultura em regiões de clima temperado ou subtropical (BARCELLOS et al., 2001), o jundiá tem sido alvo de pesquisa em diferentes áreas, incluindo para avaliações comportamentais (ABREU et al., 2016). Nos últimos anos, o jundiá tem se mostrado um excelente modelo animal para estudos de fisiologia, e mais recentemente, também para estudos comportamentais. Embora ainda haja poucos estudos que possam ser tabulados e analisados por software, alguns estudos têm fornecido informações interessantes sobre o comportamento desses animais, incluindo sua preferência por ambientes que se assemelham ao seu habitat natural. Por

exemplo, em um estudo realizado por Barcellos et al. (2009), em que foi analisada a preferência do jundiá por ambientes com e sem abrigos e sua preferência pelas cores dos tanques. Abaixo Figura 1 demonstra um exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*) adulto.

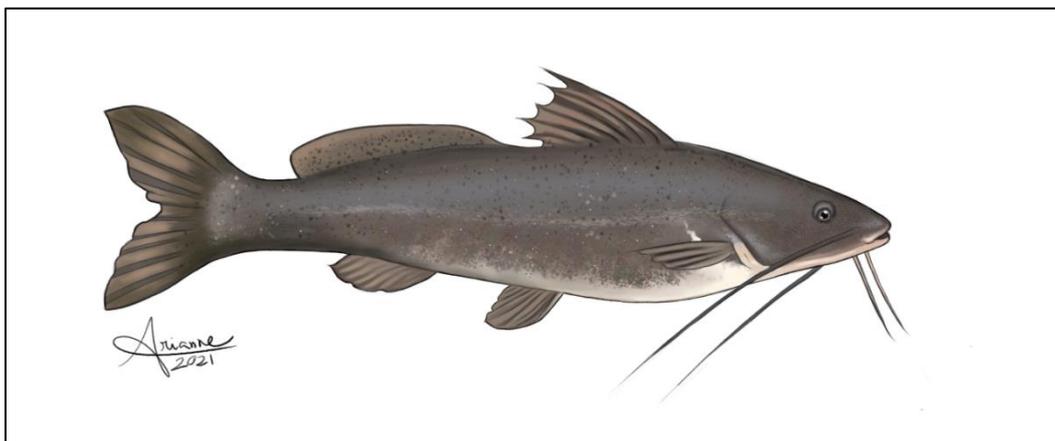


Figura 1. Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen* adulto

4. Material e métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Aquicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. Projeto avaliado pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocolo nº 35329).

O experimento foi conduzido comparando os resultados para a qualidade seminal, sucesso reprodutivo e análise comportamental das larvas a partir do sêmen criopreservado e fresco (controle) paternos.

Jundiás (*R. quelen*) com um ano de idade, oriundos da mesma prole, foram aclimatados em sistemas de recirculação de água (filtragem biológica), em temperatura constante de 24 ± 2 °C; aeração de $5,5 \pm 1$ mg /L; amônia de 0,25 ppm; pH de $7,0 \pm 0,5$ e fotoperíodo natural. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (8 h e 16 h) com dieta comercial (32% de proteína bruta,

Acqua Fish, Supra®, Alisul, Brasil) até a saciedade aparente. Os experimentos com peixes foram conduzidos usando procedimentos consistentes com as diretrizes ARRIVE e o Guia do *National Institutes of Health* para o cuidado e uso de animais de laboratório (*NIH Publications* No. 8023, revisado em 1978). Em todas as manipulações (coleta de amostras), os peixes foram cobertos com toalhas úmidas, especialmente os olhos, e manuseados com luvas de lã para proteção do manipulador e do animal. Para a primeira parte do experimento, utilizamos um total de 23 animais adultos, 19 machos e quatro fêmeas, onde foram produzidas as larvas para posterior aplicação dos testes comportamentais.

Para os filhotes provenientes da reprodução que foi realizada, a alimentação foi feita através do fornecimento de artêmia recém eclodidas, ração triturada, ovo cozido triturado com leite em pó e mistura de fígado de frango com ácido ascórbico (700 g de fígado/5 g de ácido ascórbico). Assim que adquiriram tamanho suficiente para não passarem pela tela das hapas, foram transferidos para o sistema de água verde, que fornece também alimentação natural.

Na segunda fase do experimento, para avaliar o comportamento de larvas e juvenis, utilizamos os animais provenientes da fertilização. Para o teste comportamental de larvas com 5, 10, 15 e 20 dias pós fertilização, foram utilizados um total de 160 animais, sendo 20 animais de cada fêmea para cada repetição do teste. Já para a análise comportamental de juvenis com 90 dias, utilizamos 128 animais (sem distinção de sexo), sendo 32 animais oriundo de cada fêmea.

4.1 Indução hormonal e criopreservação seminal

A indução hormonal foi realizada com aplicação intramuscular de extrato de hipófise de carpa na concentração de 3 mg/kg (pituitária/peso do peixe) em seringa de insulina (1 mL) e agulha 13 x 0,45 mm. A temperatura foi mantida em $25,0 \pm 1$ °C em sistema de recirculação com controle de temperatura. A coleta do sêmen foi realizada após completar 240 horas-grau com suave massagem abdominal (direção encéfalo-caudal). A primeira porção do sêmen foi descartada para evitar possível contaminação. A coleta foi realizada em tubo cônico Falcon

de 15 mL. As amostras foram mantidas a 4 °C até a coleta do total de machos e avaliações prévias antes do congelamento.

Antes da formação do *pool* de sêmen dos 19 animais, foi analisada a motilidade, para assegurar não ter havido ativação prematuramente, bem como a capacidade de iniciar a motilidade de cada amostra coletada. A avaliação da motilidade subjetiva e da concentração espermática em cada *pool* foi realizada com um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão), objetiva de 40X.

Para a criopreservação utilizamos o protocolo de ADAMES et al. (2015), sendo a solução composta por leite em pó desnatado (50 g/L), metanol (100 mL/L) e frutose (50 g/L). O sêmen foi diluído na solução crioprotetora na proporção de 1:3 (sêmen:solução crioprotetora). Após a diluição o sêmen foi acondicionado em palhetas de 0,25 mL. As palhetas foram armazenadas e resfriadas em vapor de nitrogênio líquido (*dry shipper*), após 18 horas transferidas para o botijão e mergulhadas em nitrogênio líquido, e armazenadas até o dia da fertilização, respeitando o período mínimo de sete dias. Para o descongelamento das amostras, as palhetas foram aquecidas em banho maria à 25°C/10 segundos (ADAMES et al., 2015). Posteriormente, realizou-se as avaliações dos parâmetros de motilidade e cinética espermática, morfologia e integridade de membrana, além da taxa de fertilização.

4.2 Avaliação de qualidade do sêmen

Todas as análises de avaliação de qualidade seminal foram realizadas para as amostras descongeladas e para o sêmen fresco (controle). Os parâmetros cinéticos dos espermatozoides foram analisados pelo Computer-assisted sperm analysis (CASA), conforme relatado e recomendado por WILSON-LEEDY & INGERMANN (2007) e SANCHES et al. (2010). Os parâmetros espermáticos analisados foram: taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do caminho (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retidão do caminho espermático (STR), oscilação (WOB) e frequência cruzada de batimento (BCF). Para essas análises, a amostra do *pool*

de sêmen foi colocada em uma câmara de Neubauer e ativada com água destilada (0,8 µL de sêmen para 1000 µL de água destilada). A análise foi realizada com 10 segundos após a ativação, e os vídeos foram editados no *software virtualDUB 1.9.0* (Virtualdub.org) para posteriormente os vídeos serem avaliados pelo *plugin CASA no software IMAGE J* (imagej.nih.gov/ij).

A porcentagem de células com membrana intacta foi avaliada utilizando os corantes Eosina-Nigrosina pelo método adaptado de Blom (1950) onde 10 µL de sêmen é misturado a 30 µL de cada corante (eosina amarela 3% e nigrosina 5%). Após a confecção e secagem das lâminas, foram analisadas por meio de microscópio óptico em aumento de 40X, sendo quantificado o percentual de espermatozoides com membrana íntegra em 200 espermatozoides por lâmina. Os espermatozoides que apresentaram a cabeça não corada foram considerados íntegros e os não íntegros os espermatozoides foram aqueles com a cabeça corada.

4.3 Fertilização

Para obtenção dos oócitos, animais sexualmente maduros de *R. quelen*, foram induzidos com extrato de hipófise de carpa (CPE). As fêmeas, com peso médio de 700g, receberam um total de 5,5 mg/kg (CPE/peso do peixe), dose total em 10:90 % com intervalo de 12 horas. Após 240 horas- grau a partir da segunda aplicação, os oócitos foram obtidos através de uma massagem anteroposterior na região abdominal. Durante a coleta de oócitos, foi evitada a contaminação com fezes, sangue ou urina, limpando a região urogenital com lenço seco. As amostras de oócitos de cada animal foram divididas para fecundação com o sêmen fresco e com o sêmen criopreservado/descongelado em uma proporção de aproximadamente 90.000 espermatozoides de cada *pool* para 1 oócito. A dosagem de sêmen foi determinada de acordo com a concentração espermática previamente analisada. Após a fertilização dos oócitos com sêmen criopreservado e fresco, os prováveis zigotos foram incubados em duplicatas para cada origem dos oócitos combinados com sêmen fresco e criopreservado. A água das incubadoras foi mantida aquecida a

24,0 ± 0,5 ° C, e após 10 horas de incubação. Quando o blastóporo fechou, foi determinada a taxa de fertilização (% ovos fertilizados) para cada unidade experimental (incubadora). Após 30 horas foi avaliado a taxa de eclosão (% de larvas eclodidas) e o percentual de larvas eclodidas com morfologia normal e com morfologia anormal. Para avaliação de morfologia seguimos conforme classificação feita por POWERS et al. (2011) e repetido por BRITO et al. (2018) para estudos de embriotoxicidade em embriões de *Rhamdia quelen* em que se analisou curvaturas, edemas cardíacos e morfologia fora do padrão.

Os embriões que apresentarem ausência de transparência, coágulos, ausência da formação de somitos ou ausência de movimento cardíaco e circulação sanguínea foram considerados indivíduos mortos. Os embriões ou larvas que conseguiram romper o córion ou membrana externa do ovo e os que expuseram toda ou grande parte da cauda para fora do ovo foram considerados eclodidos.

4.5 Avaliações comportamentais

4.5.1 Avaliação comportamental da prole com 5, 10, 15 e 20 dias após eclosão

As larvas foram colocadas individualmente em uma placa de 9 poços cheios com água do sistema para análise de desempenho locomotor durante uma sessão de 5 minutos, após 1 minuto de aclimatação.

O desempenho foi gravado e analisado por meio de software especializado *EthovisionXT*, como mostra a Figura 2. A distância total percorrida, velocidade média e número de cruzamentos foram considerados os principais parâmetros de locomoção. O processo foi repetido nos quatro dias de avaliação comportamental das larvas, mudando apenas a placa de 9 poços para 1 placa de 6 poços, nos dois últimos dias de análise, respeitando o crescimento dos animais.

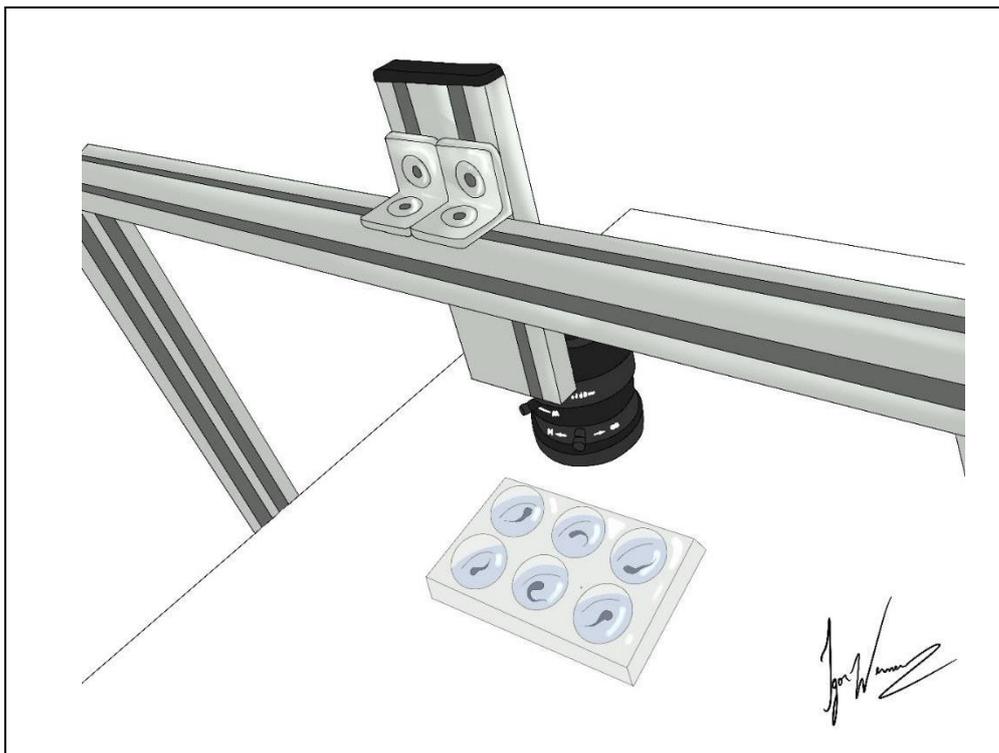


Figura 2. Aparato de avaliação comportamental de larvas. Filmado por cima.

4.6 Avaliação comportamental dos juvenis com 90 dias de idade

4.6.1 Teste do tanque novo (Avaliação da locomoção)

Para a avaliação da locomoção em teste de tanque novo (LEVIN et al. 2007), os peixes foram transferidos individualmente para um aquário de vidro transparente (30 cm de comprimento X 15 cm de altura X 18 cm de largura), filmados durante seis minutos e analisados pelo *software* especializado *EthovisionXP*. Os seguintes parâmetros foram avaliados os: velocidade de natação (m/s) e distância total percorrida (m). Abaixo, a Figura 3 ilustra o aparato em que foi feita a filmagem para avaliação de locomoção.

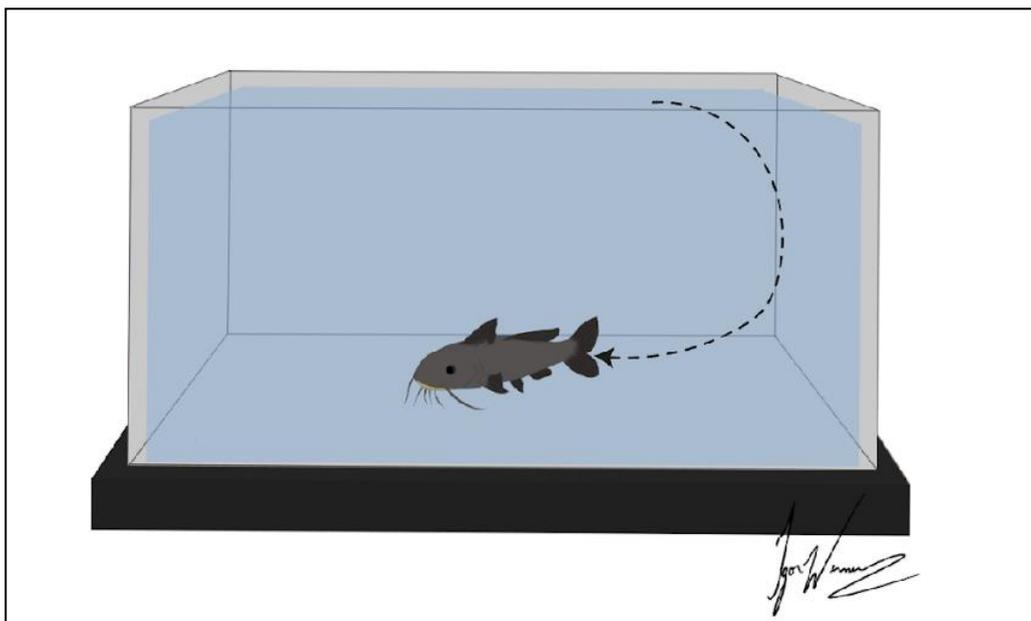


Figura 3. Aparato para analisar a atividade do animal em um tanque novo, aquário medindo 15x30x18 e filmado pela lateral.

4.6.2 Interação social

Para a análise de interação social, foi utilizado a metodologia proposta para *zebrafish* por Gerlai et al. (2000) e Krause et al (2000), adaptada para a prole dos jundiás provenientes de sêmen fresco e criopreservado. O objetivo foi medir a preferência dos animais em se aproximar do aquário vazio ou do aquário estímulo. O aparato utilizado é um aquário de 30 cm de comprimento, 15 cm de largura e 18 cm de altura, onde o animal é colocado. De um lado do aquário central é colocado um aquário sem animais e, do outro, um aquário contendo quatro jundiás.

Durante a análise do vídeo, o aquário central é dividido ao meio e o tempo de permanência do animal em cada quadrante é registrado. Uma maior permanência no quadrante próximo ao aquário estímulo indica maior interação social, enquanto uma maior permanência no quadrante próximo ao aquário vazio indica menor interação social. Esse comportamento é registrado por meio de gravações laterais dos aquários. Abaixo, na Figura 4 é ilustrado o aparato de avaliação social dos animais.

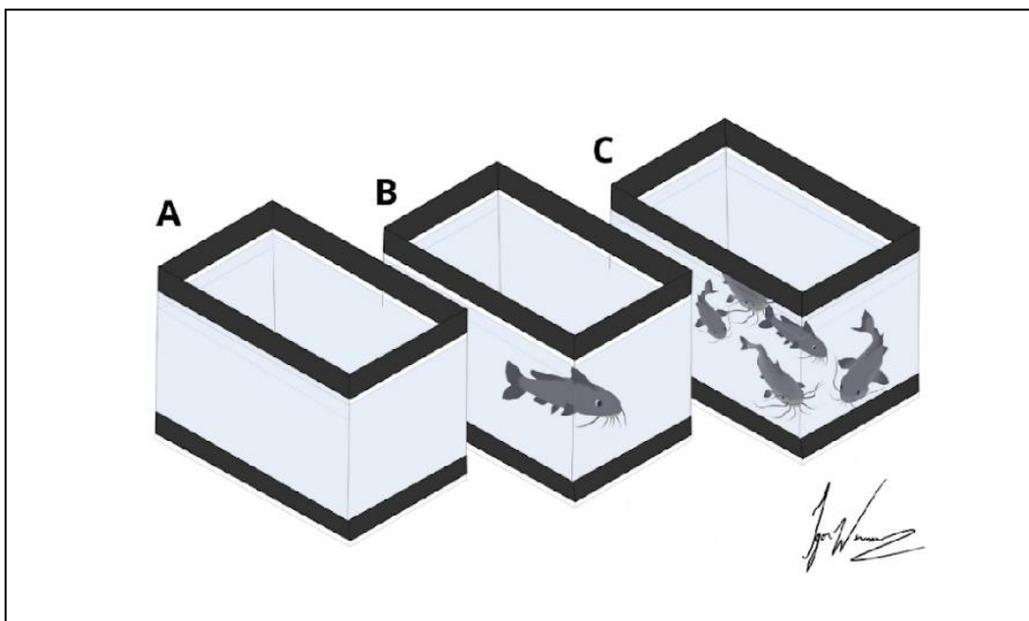


Figura 4. Aparato de análise de interação social com aquários medindo 15x30x18, sendo o A um aquário apenas com água, B onde fica o animal a ser analisado e o C com um pequeno cardume de jundiá. Filmado pela lateral.

4.6.3 Avaliação de agressividade

O comportamento dos peixes ao visualizar a sua imagem num espelho foi utilizado para quantificar indiretamente a agressividade, seguindo o método do teste do espelho (GERLAI et al., 2000) (OLIVEIRA et al, 2011). Os peixes foram colocados individualmente em um tanque experimental (30 cm de comprimento X 15 cm de altura X 18 cm de largura). Um espelho (45 cm de altura x 38 cm de largura) foi colocado na parte lateral do tanque em um ângulo de 22,5° em relação à parede do fundo do tanque, de modo que a borda vertical esquerda do espelho toque o lado do tanque e a extremidade direita fique afastada. Assim, quando o peixe analisado nada para o lado esquerdo do tanque, a sua imagem no espelho aparecerá mais perto dele.

O peixe foi colocado no tanque e aclimatado durante dois minutos, os comportamentos foram gravados de cima com uma câmera por cinco minutos. Para a avaliação, o tanque foi dividido em quatro partes iguais, permitindo a contagem do número de entradas em cada seção do tanque. A entrada para o segmento mais à esquerda indica preferência pela proximidade com o "oponente", ou seja, comportamento de agressividade, enquanto a entrada para os segmentos mais à direita indica preferência por evitar o "oponente". A quantidade de tempo que o peixe analisado gastou em cada segmento foi mensurado utilizando o software *EthovisionXP*. Abaixo, a Figura 5 ilustra o aparato de avaliação de agressividade.

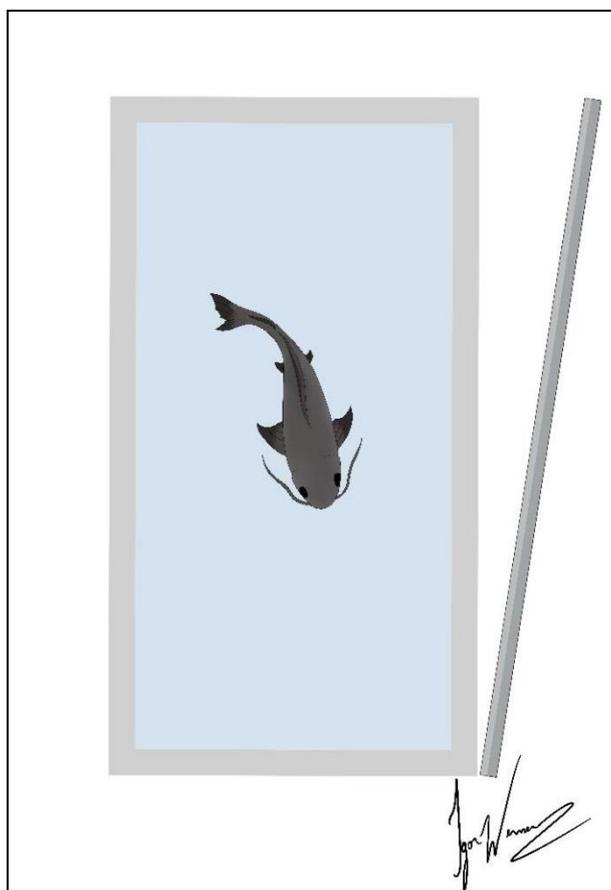


Figura 5. Aquário de avaliação de agressividade com aquário medindo 15x30x18 com espelho angulado em 22,5 graus.

4.6.4 Teste claro/escuro

Para avaliar a preferência dos animais para ambientes claros ou escuros (SERRA et al, 1999) utilizamos um tanque de vidro (30 cm de comprimento X 15 cm de altura X 18 cm de largura) dividido ao meio com uma zona clara e uma zona escura definido por filmes adesivos plásticos opacos nas cores preto ou branco cobrindo externamente paredes, piso, e os lados correspondentes. Os peixes foram colocados individualmente no meio do aquário e as seguintes medidas foram registradas por cinco minutos: tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro, o tempo gasto no compartimento claro e o número de cruzamentos entre os compartimentos. Para este teste comportamental os animais também foram gravados de cima.

A quantidade de tempo que o peixe analisado gastou em cada compartimento foi mensurado no software *EthovisionXP*. Abaixo, a Figura 6 ilustra o aparato de avaliação comportamental de preferência pelo claro ou escuro, filmado de cima.

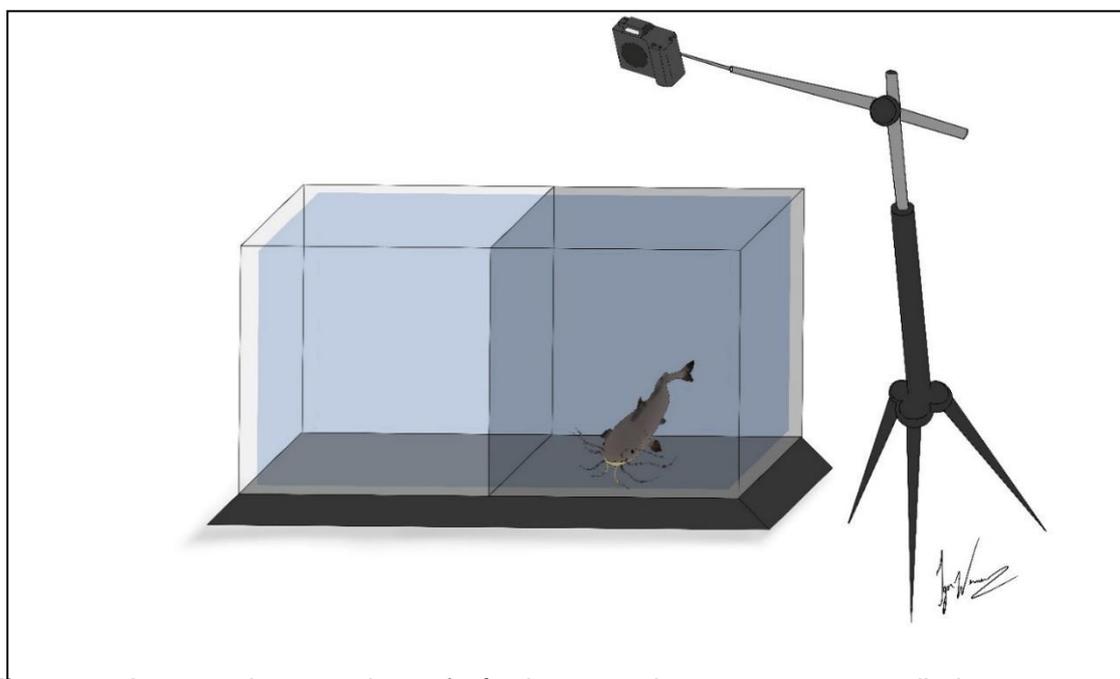


Figura 6. Aparato de teste de preferência entre claro ou escuro, medindo 15x30x18. filmado de cima.

4.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade (Shapiro Wilk e/ou Kolmogorov-Smirnov) e de homogeneidade de Bartlett. Para todas as variáveis (com exceção da avaliação comportamental das larvas), os dados que apresentaram distribuição normal, foram analisados por meio do teste T-Student, e para as variáveis não paramétricas, foi aplicado um teste de Mann-Whitney. Para avaliação do comportamento das larvas ao longo de 20 dias de idade, foi realizada uma análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), considerando os efeitos dos grupos experimentais (Fresco e criopreservado), do tempo (Idade de 5, 10, 15 e 20 dpf) e a interação entre os fatores. Todas as análises foram realizadas considerando uma significância de 5%, no software GraphPad Prism 7.0.

5 Resultados

5.1 Qualidade seminal

5.1.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

Os resultados da análise de motilidade e cinética espermática de amostras frescas e criopreservadas de sêmen de jundiá podem ser observados na Figura 7. A motilidade (Fig 7a), foi maior ($p < 0,0001$) no sêmen fresco ($94,92 \pm 3,85\%$) em relação ao criopreservado ($64,75 \pm 6,43\%$), assim como para o VCL (Fig 7b) ($p = 0,0060$) sêmen fresco atingindo $88,16 \pm 6,90 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ em comparação ao criopreservado com $82,58 \pm 6,26 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ e na progressividade (Fig 7g) ($p = 0,0001$) $2627 \pm 298,3 \mu\text{m}$ (sêmen fresco), quando comparado ao criopreservado, $2100 \pm 299,4 \mu\text{m}$. Já o batimento flagelar (Fig 7h) diferentemente das outras variáveis, foi maior ($p = 0,0211$) no grupo criopreservado ($49,33 \pm 1,69 \text{ Hz}$) em relação ao controle fresco ($47,97 \pm 1,25 \text{ Hz}$). Não houve diferença entre os grupos experimentais para as variáveis de VSL ($p = 0,0611$), VAP ($p = 0,0698$), STR ($p = 0,6164$) e WOB ($p = 0,9371$).

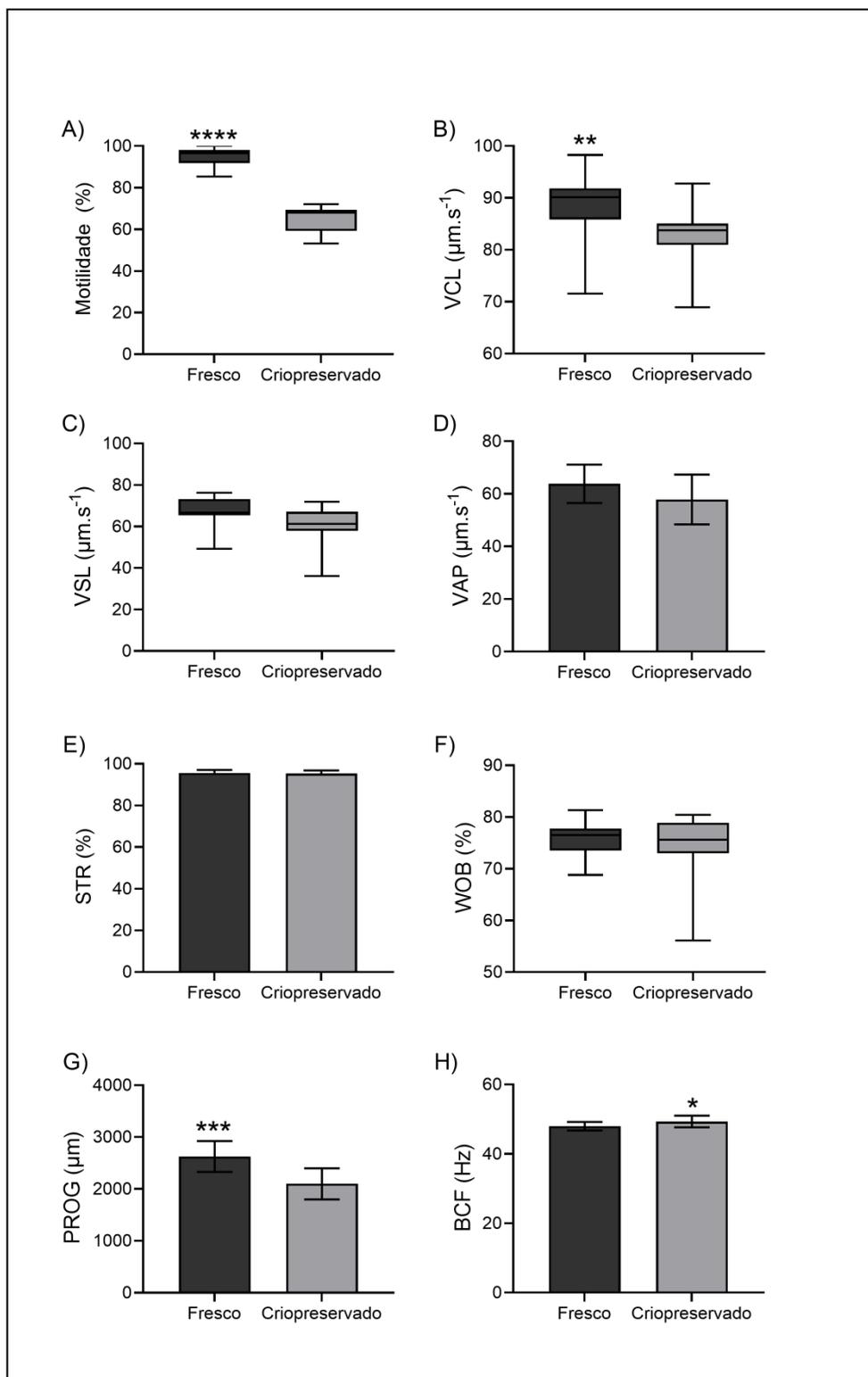


Figura 7. Análise de motilidade e cinética espermática por meio do CASA - Computer-assisted sperm Analysis. As variáveis Motilidade (A), VCL (B), VSL (C) e WOB (F), foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis VAP (D), STR (E), PROG (G) e BCF (H), foram analisadas pelo teste T-Student. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$. Fresco (n=19); criopreservado (n=9).

5.1.2 Integridade de membrana, taxa de fertilização, eclosão e larvas normais e anormais

Na figura 8, podemos observar os resultados da análise de integridade de membrana dos espermatozoides e as taxas de fertilização, eclosão e larvas com morfologia normal. Não houve diferença entre os grupos para nenhuma das variáveis, como a integridade de membrana ($p=0,0839$), fertilização ($p=0,2403$), eclosão ($p=0,1769$) e larvas normais ($p>0,9999$).

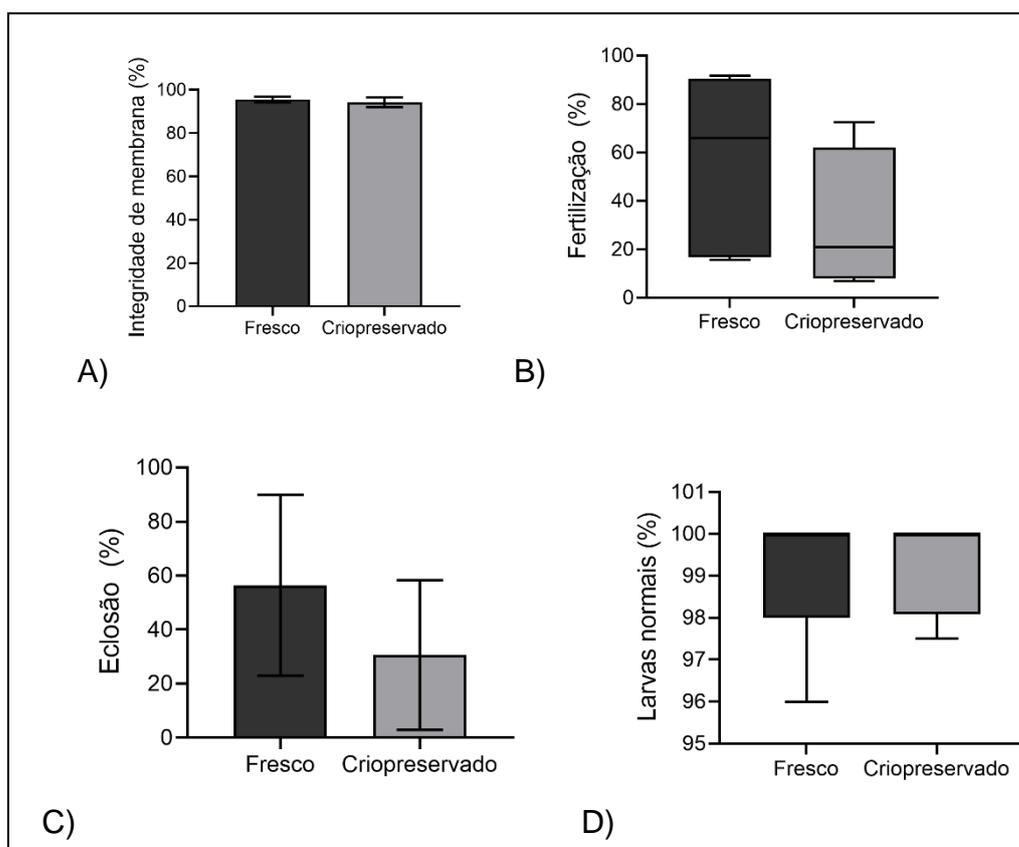


Figura 8. Integridade de membrana e capacidade fecundante do sêmen de jundiá fresco e criopreservado. As variáveis Integridade de membrana (A) ($n=15$) e Taxa de eclosão (C) ($n=6$), foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis de taxa de fertilização (B) ($n=6$), e % de larvas normais (D) ($n=6$), foram analisadas pelo teste T-Student.

5.2 Comportamento da prole

5.2.1 Comportamento larval

O comportamento de larvas de 5 dpf até os 20 dpf, provenientes de reprodução com sêmen fresco e criopreservados podem ser observados na Figura 9. Não houve efeito significativo da criopreservação sobre o comportamento das larvas em nenhuma das variáveis observadas. Houve maior distância percorrida (Fig. 9a) pelos animais com 20 dpf, em relação aos animais mais jovens, para os dois grupos experimentais. Para a velocidade média percorrida (Fig. 9b), no grupo controle (fresco), o maior valor foi observado nos animais com 20 dpf, e o menor valor nos animais com 5 dpf, enquanto no grupo criopreservado, o maior valor foi nos peixes com 20 dpf, diferindo significativamente dos animais com 5 e 10 dpf. A permanência das larvas na zona interna (Fig. 9c) foi maior na idade de 10 dpf, nos dois grupos experimentais, em relação às demais idades. Já a permanência das larvas na zona externa (Fig. 9d), foi maior nas larvas com 5 e 20 dpf, diferindo das larvas com 10 dpf, no grupo controle fresco, enquanto no grupo criopreservado, o maior valor observado foi nas larvas com 5, 15 e 20 dpf, em relação aos animais com 10 dpf.

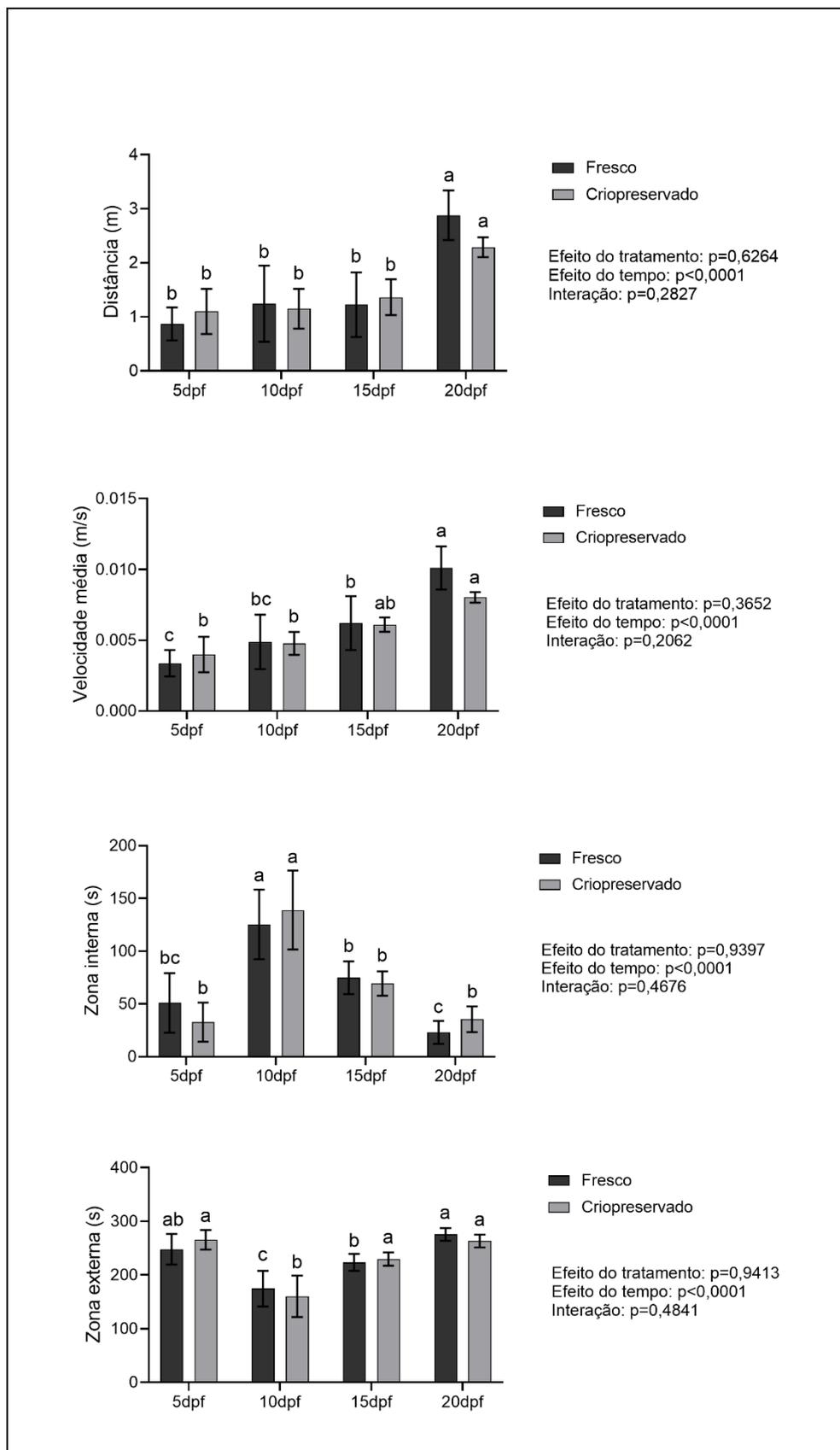


Figura 9. Comportamento de larvas de jundiá provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), considerando os efeitos dos grupos experimentais (criopreservado e fresco), do tempo (idade dos animais) e a interação. Letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa

entre as idades dos animais, dentro do mesmo grupo experimental, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). $n=4$.

5.2.2 Comportamento de juvenis 90 dpf

5.2.2.1 Locomoção

Na figura 10 podemos observar a avaliação da locomoção de jundiás com 90 dias de idade provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Não houve diferença entre os grupos experimentais para a distância percorrida ($p=0,2000$), tempo móvel ($p=0,1003$), tempo na zona superior ($p=0,6857$) e tempo na zona inferior ($p=0,4976$).

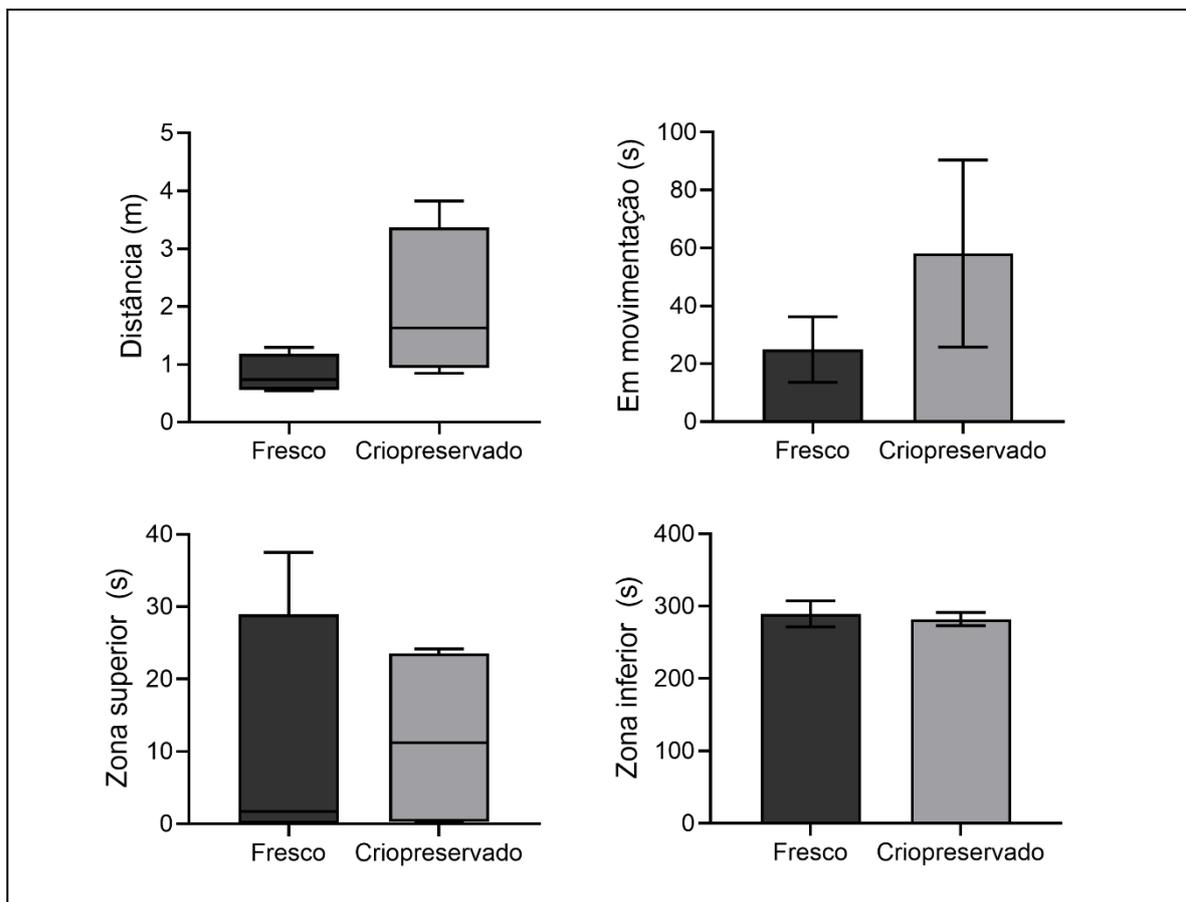


Figura 10. Avaliação da locomoção de animais provenientes de sêmen fresco e criopreservado. As variáveis distância percorrida (A) e zona superior (C), foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis de tempo móvel (B), e zona inferior (D), foram analisadas pelo teste T-Student. $n=4$.

5.2.2.2 Interação Social

Como pode ser visto na figura 11, nossos resultados mostraram a permanência deste comportamento durante os testes de interação social, em que os animais já estavam em um período pós-ambientação. O processo de criopreservação não trouxe alteração no comportamento social entre os dois grupos testados sendo ($p=0.6845$) entre os grupos experimentais.

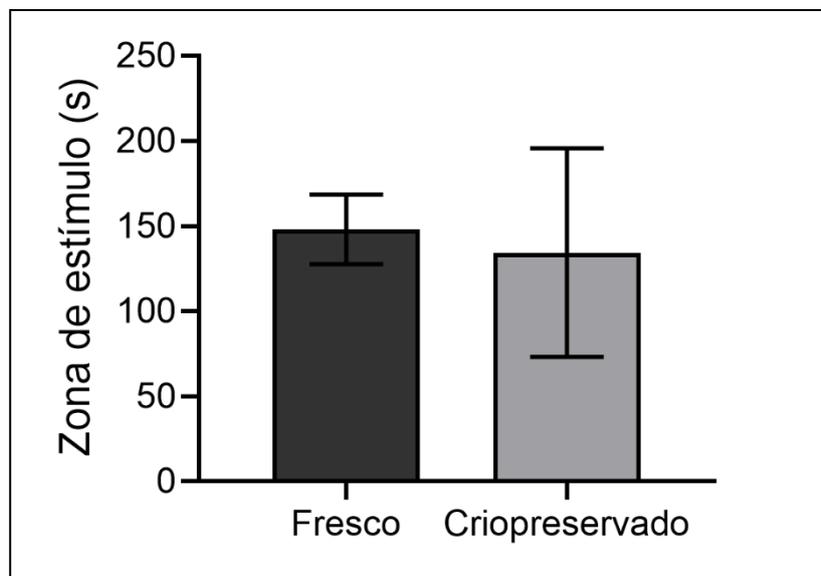


Figura 11. Avaliação da interação social de animais provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Dados analisados pelo teste T-Student. $n=4$.

5.2.2.3 Agressividade

Não houve diferença entre os grupos experimentais para as variáveis de agressividade testadas (Figura 12). Demonstrando que a criopreservação não faz com que a prole apresente maior ou menor comportamento agressivo.

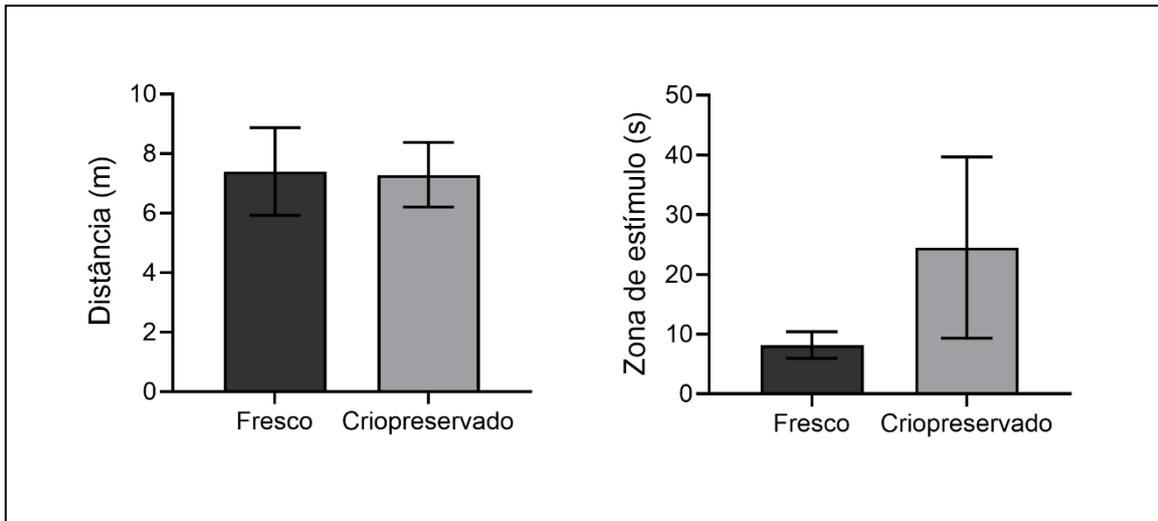


Figura 12. Avaliação da agressividade de animais provenientes de sêmen fresco e criopreservado. Variáveis foram analisadas pelo teste T-Student.

5.2..2.4 Claro/escuro

Até o momento da escrita desta dissertação os dados referentes a este comportamento não estavam disponíveis.

6. Discussão

No contexto em que efeitos negativos da criopreservação podem acontecer, este estudo investigou se ocorria alguma alteração comportamental nos animais gerados a partir de amostras de células reprodutivas criopreservadas., neste caso o sêmen. As respostas inéditas deste estudo, somam em responder um dos principais questionamentos sobre o uso de células reprodutivas criopreservadas. A prole gerada a partir de bancos de germoplasma muda seu comportamento? Aqui podemos afirmar que nos bagres, não se altera o comportamento com até 20 dias após a eclosão.

A toxidez celular esperada pelo crioprotetor , pode ser facilmente observada à medida que interpretamos os resultados dos índices cinéticos dos espermatozoides. Notadamente foi observada uma maior lentidão, (motilidade menor) nos espermatozoides oriundos do sêmen dos animais criopreservados. Logo, os outros índices cinéticos dos espermatozoides confirmam este cenário.

Neste caso, o BCF deveria ser maior nos espermatozoides que foram criopreservados, o que de fato ocorreu e por consequência o VCL e o PROG menores, e que também marcadamente ocorreu. Um espermatozoide mais lento, além de ter menor velocidade curvilínea (VCL), também levará mais tempo cruzar repetidas vezes esta mesma curva (expressa pelo BCF) e por consequência ainda percorrerá um menor espaço durante a gravação do vídeo do CASA (PROG). Visto por Da Costa et al. (2018), houve uma redução de 80% para 35% de motilidade no sêmen criopreservado e Neumann et al. (2019) que comparou a motilidade de sêmen descongelado e ativado em diferentes períodos, onde houve uma redução de motilidade de 80% para 62% no período mais curto, no nosso trabalho, tivemos um protocolo que apresentou resultados dentro dos padrões de qualidade esperados. Quanto à análise estrutural dos espermatozoides (integridade de membrana) e de produção (taxas de fertilização, eclosão e larvas normais) não houve diferença quanto à origem do sêmen que foi utilizado no processo (criopreservado ou fresco). Inferências sobre integridade de membrana isoladamente, nos conduz a interpretação que o protocolo de criopreservação usado para jundiá é eficiente, desde o seu desenvolvimento por (Adames, 2015). Alguns estudos mais recentes, como os de Pérez-Atehortúa et al. (2021) e França et al. (2022) mostraram a eficiência do protocolo de criopreservação para o *R. quelen* quanto a manutenção da integridade de membrana.

Como não houve diferenças as taxas de fertilização e eclosão assim como a de larvas normais, quanto a origem do sêmen criopreservado e fresco do *R. quelen*, a robustez destas informações geradas, seguramente este fato aumenta a confiabilidade das respostas, e deste peixe como modelo para aferir as validações quanto ao comportamento da prole a partir de espermatozoides criopreservados. Um questionamento possível de ocorrer, relacionando os índices cinéticos com o estrutural e de produção, facilmente pode ser esclarecido quando asseguramos uma relação ideal de espermatozoides:oócitos (90.000:1), neste estudo, de acordo com a recomendação de Adames et al. (2015) chegando ao nível de fertilização ideal.

Neste trabalho, avaliamos em larvas a distância percorrida por elas, o que é uma medida importante do comportamento, porque fornece informações sobre

a atividade, mobilidade e capacidade de navegação. Uma série de caminhos neurais que são comuns em vertebrados, como visto por GRILLNER et al. (2019) e em *zebrafish*, e por HORZMANN et al. (2016), também estão diretamente relacionados com este comportamento específico. Importante ressaltar que esse é um comportamento que, qualquer alteração, pode ser extrapolado para outras espécies. A distância percorrida pode ser usada como indicador de desenvolvimento, já que as larvas geralmente aumentam essa distância à medida que crescem e se desenvolvem (BASNET et al., 2019). Isso foi observado em nosso estudo, tanto para jundiás provenientes de reprodução artificial utilizando sêmen fresco quanto criopreservado, indicando que o protocolo não afetou este comportamento natural e inicial dos animais, não tivemos diferenças entre os grupos. Quando as larvas chegaram aos 20 dias de idade, a distância percorrida aumentou em relação à idade anterior, demonstrando um desenvolvimento normal. A distância percorrida também pode ser usada para avaliar a natação das larvas, incluindo velocidade, direção e regularidade. Por exemplo, uma distância menor pode indicar uma natação mais lenta ou menos coordenada, enquanto uma distância maior pode indicar uma natação mais ativa e eficiente. Além disso, a distância percorrida pode ser usada para avaliar a resposta das larvas a diferentes condições ambientais, como a presença de predadores, comida, obstáculos e intensidade de luz.

Do ponto de vista macro, a distância percorrida é uma medida importante do comportamento larval, relacionando esta resposta às condições ambientais. Por exemplo, em nosso estudo, houve uma tendência que ao longo do desenvolvimento, as larvas exploram o ambiente, como visto no décimo dia de avaliação comportamental. Nos dias subsequentes, a tendência destes animais foi de deslocarem para as bordas do aparato, que é uma resposta ao estímulo da luz provocado por uma aversão dos animais nesta idade. (BEHR et al., 1999; BARCELLOS et al., 2009). Esta informação é valiosa para entender a biologia das larvas e avaliar o impacto de fatores externos em sua sobrevivência. Uma hipótese a ser considerada, diz respeito a uma adaptação das larvas de peixes, originadas de sêmen criopreservado (a partir de bancos de germoplasma), quando usadas em programas de repovoamento. Não havendo perda do ponto de vista comportamental para as larvas de jundiá, nos permite afirmar que a sua

capacidade de sobreviver e deixar descendentes, sem prejuízo no seu *fitness* estaria assegurada independente da origem do sêmen (fresco ou criopreservado).

Para os juvenis de 90 dias pós-fertilização, foram realizados testes nos quais foram avaliados locomoção, atividade em um novo tanque, agressividade e preferência por ambiente claro ou escuro. O teste de comportamento de locomoção realizado em um tanque novo permitiu avaliar a movimentação dentro dos aquários e quantificá-la. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos, ambos apresentaram comportamento de peixes bentônicos, permanecendo mais tempo na zona inferior do aquário. Em *zebrafish*, o comportamento de permanecer no fundo do aquário em um teste de tanque novo indica comportamento de estresse e exploração do ambiente, sendo um animal que, em situações ambientadas, tende a permanecer em zonas superiores dentro do aquário.(LEVIN et al, 2007) (CACHAT et al, 2010, 2011) Em nosso caso, o jundiá é um animal de atividade menor (SCHULZ, 2006) e maior tendência a buscar o fundo e abrigos, o que deve ser interpretado como comportamento normal da espécie (BARCELLOS et al.,2009)

Em geral, o jundiá é um animal pacífico, mas pode se tornar agressivo em situações de disputa por território, reprodução ou alimento (JOBBLING, 1994). Em cativeiro, os jundiás não costumam ser agressivos com outros indivíduos da mesma espécie quando adultos, dependendo de sua estocagem (PIAIA, 2000). Em nosso estudo com o teste de agressividade, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Entretanto, observamos que alguns animais apresentaram uma tendência a permanecer mais tempo na zona com estímulo, o que sugeriria uma possível tendência a serem mais agressivos. Este dado deve ser analisado de forma mais ampla, além do resultado obtido pelo *software* e análise estatística, durante o teste também medimos a distância percorrida pelos animais e observamos onde eles ficaram durante a gravação, o que nos permitiu identificar um padrão de permanência do animal no campo do aquário em que se direcionaram ao entrarem no aparato, o que não diferiu entre os dois grupos, indicando que podem não responder ao estímulo do espelho.

Com as análises de comportamento de cardume, sabemos que os jundiás são conhecidos por viverem em cardumes (GOMES et al., 2000). Nossos animais são criados em cativeiro e em cardumes dentro dos tanques, como visto estatisticamente, este comportamento permanece preservado no nosso experimento, existindo uma preferência em manter esse comportamento, corroborada pelo estudo de ABREU et al, (2016).

Como sugestão e melhores respostas comportamentais, o uso de espécies diferentes para testar territorialidade e agressividade possam ser mais conclusivos, como protocolo desenvolvido para *zebrafish* com a imagem de seu predador natural colocada em vídeo do lado do aquário (AHMED et al.,2011), ou utilização de extrato de epitélio contendo células de alarme colocados em tanques. Ressaltamos também a importância de compreender o comportamento do jundiá através de etogramas detalhados, assim podendo identificar animais, que mesmo dentro do mesmo cardume, possuem “personalidade”, como visto em *zebrafish* (DAHLBOM et al., 2011) juntamente com a diferença entre machos e fêmeas (RAMBO et al., 2017).

7. Conclusão

O protocolo de criopreservação seminal do *R. quelen* não altera os índices comportamentais das larvas de jundiás com até 20 dias após a fertilização, nem comportamentos de locomoção em tanque novo, interação social e agressividade dos juvenis de 90 dias pós fertilização.

8. Considerações finais

Os resultados indicaram que o protocolo não teve um impacto significativo na qualidade seminal ou no comportamento dos peixes. O protocolo de criopreservação seminal para esta espécie, vem sendo aprimorado e frequentemente testado com diferentes objetivos. No caso de nosso estudo entendemos ter sido um atestado de confiabilidade para experimentação

comportamental, produzindo condições qualitativas muito próxima do sêmen fresco. Já para avaliação comportamental de animais provenientes de criopreservação, essa é a primeira observação, já que não há estudos na literatura sobre o tema, e com isso é um achado extremamente importante para somar a outros estudos de criopreservação.

Os resultados indicam que a criopreservação do sêmen não afetou negativamente o comportamento da prole e que a técnica de criopreservação pode ser considerada uma ferramenta segura para a preservação do sêmen dessa espécie. No entanto, é importante ressaltar que outras análises devem ser realizadas para avaliar outros aspectos importantes e de que essa resposta possa ser diferente para outras espécies, especialmente naquelas em que o protocolo de criopreservação não está bem estabelecido e não é tão eficiente. Este estudo contribui para a compreensão dos efeitos da criopreservação do sêmen na prole e pode ser útil para orientar a aplicação da técnica de criopreservação. É fundamental que novos estudos sejam realizados para expandir o conhecimento sobre este tema e garantir a qualidade e segurança dos programas de criopreservação de sêmen.

Preservar o comportamento natural do jundiá é fundamental para sua adaptação e sobrevivência no ambiente natural, bem como para sua criação em cativeiro. O comportamento afeta aspectos como alimentação, crescimento, reprodução, interação intra e interespecies como caça e fuga, e compreender o comportamento da espécie pode ajudar a melhorar as condições de criação e aumentar a produtividade. Portanto, ao entender melhor a diversidade biológica e a evolução do comportamento animal, podemos contribuir para aprimorar diversas áreas da ciência e da tecnologia.

9. Referências:

ABREU, M. S. *et al.* Evaluating “anxiety” and social behavior in jundiá (*Rhamdia quelen*). **Physiology and Behavior**, New York, v. 160, p. 59–65, 1 jun. 2016.

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. 119–128, 1 out. 2015.

AHMED, O.; SEGUIN, D.; GERLAI, R. An automated predator avoidance task in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 216, n. 1, p. 166–171, 1 jan. 2011.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, n.81, 459-469, 1987.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, London, v. 30, p. 1-14, jan. 2006.

AMARAL JR, H. *et al.* **Assim cultivamos o Jundiá *Rhamdia quelen* no estado de Santa Catarina**. Camburiú: EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC, 2015. 78 p.

ÅTLAND, Å. Behavioural responses of brown trout, *Salmo trutta*, juveniles in concentration gradients of pH and Al - A laboratory study. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 331–345, 1998.

BARCELLOS, L. J. G. *et al.* Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 1–2, p. 51–56, 2 mar. 2009.

BARCELLOS, L. J. G. *et al.* Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, Oxford, n. 32, p. 121 – 123, 2001.

BARCELLOS, L. J. *et al.* Estresse em Peixes: Fisiologia da resposta ao estresse causas e consequências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 26, p. 99-111, 2000.

- BEHR, E. R. *et al.* Influência de diferentes níveis de luminosidade sobre o desempenho de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) (Quoy e Gaimard, 1824) (Pisces: pimelodidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.21, p. 325-330,1999.
- BASNET, R. M. *et al.* Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. **Biomedicines**, Basel, v.7, p.23, mar. 2019.
- BATISTA, Rômulo. **Criopreservação de sêmen de zebrafish**. 2020. 191 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.
- BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fertility and sterility**, New York, v. 1, n. 3, p. 223–238, may 1950.
- BONAN, C. D.; NORTON, W. H. J. The utility of zebrafish as a model for behavioural genetics. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, London, v.2, p.34-38, abr. 2015.
- BRITZ, P. J.; PIENAAR, A. G. Laboratory experiments on the effect of light and cover on the behaviour and growth of African catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). **Journal of Zoology**, Oxford, n. 227, p. 43-62, 2009.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 222, n. 1-4, p. 89-96, 2003.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n.5 p. 623-635, out. 2010.
- CACHAT, J. *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, London, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, out. 2010.
- CACHAT, J. *et al.* Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, e17597 2011.
- CARVALHO, A.F.S. *et al.* Efficacy of fish embryo vitrification protocols in terms of embryo morphology — a systematic review. **CryoLetters**, Luton, v.35, p.361-370, 2014.
- CHAO, N.-H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n.1–4, p.161-189, June 2001.
- CHOI, T. Y. *et al.* Zebrafish as an animal model for biomedical research. **Experimental and Molecular Medicine**, New York, v.53, p. 310-317, 1 mar. 2021.

COSTENARO-FERREIRA, C. *et al.* Cannibalism management of jundiá fry, *Rhamdia quelen*: Behavior in heterogeneous batches fed on food with different particle sizes. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 185, p. 146–151, dez. 2016.

CURLEY, J. P.; MASHOODH, R.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetics and the origins of paternal effects. **Hormones and Behavior**, New York, v. 59, n. 3, p. 306-314, 2011.

DAHLBOM, S. J. *et al.* Boldness predicts social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p.1-7, ago 2011.

DE ANDRADE BRITO, I. *et al.* Embryo toxicity assay in the fish species *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptaridae) to assess water quality in the Upper Iguaçú basin (Parana, Brazil). **Chemosphere**, Amsterdam, v. 208, p. 207–218, 1 out. 2018.

DE MELLO, F. *et al.* The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. **General and Comparative Endocrinology**, Orlando, v. 245, p. 94–101, maio 2017.

DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* Influences of Sex and Age on the Hematological Profile of the Jundiá (Silver Catfish) *Rhamdia quelen*. **Journal of Aquatic Animal Health**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 161–165, jul. 2016.

EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. **Asian Journal Andrology**, Pequim, v. 8, n. 2, p. 131-142, , 2006.

FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam , v. 14, n. 6, p. 709–714, , 2007.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, New York, v.60, p.45-53, , 2010.

FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R. *et al.* Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v. 78, n. 4, p. 761–772, , abr. 2008.

GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, Bethesda, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.

GARCÍA-PALOMARES, S. *et al.* Long-term effects of delayed fatherhood in mice on postnatal development and behavioral traits of offspring. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 80, n. 2, p. 337–342, fev. 2009.

GERLAI, R. High-throughput behavioral screens: The first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 4, p. 2609–2622, abr. 2010.

GERLAI, R. Zebrafish phenomics: Behavioral screens and phenotyping of mutagenized fish. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, London, v. 2, p. 141-147, 2015.

GERLAI, R. Animated images in the analysis of zebrafish behavior. **Current Zoology**, Pequim v. 63, n. 1, p. 35–44, fev. 2017.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, New York v. 67, n. 4, p. 773-782, 2000.

GOES, M. D. *et al.* Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: Reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology**, New Orleans, v. 88, p. 254-263, jan. 2017.

GONYOU, H. W. Why the Study of Animal Behavior Is Associated with the Animal Welfare Issue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 8, p. 2171-2175, Aug. 1994.

GRILLNER, S.; MANIRA, A. EL. Current Principles of Motor Control, with Special Reference to Vertebrate Locomotion. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 75, n. 1, p. 1-80, 1995.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 99p. 1980.

HAFEZ, E. S. E. **The Behaviour of Domestic Animals**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1962.

HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. **Toxics MDPI**, Basel, AG., 27 ago. 2016.

HRÓBJARTSSON, A. *et al.* Observer bias in randomized clinical trials with measurement scale outcomes: a systematic review of trials with both blinded and nonblinded assessors. **CMAJ. Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 185, n. 4, 5 mar. 2013.

JABLONKA, E.; RAZ, G. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 84, n. 2, p. 131-176, jun. 2009.

JIANG, L. *et al.* Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. **Cell**, Cambridge, v. 153, n. 4, p. 773–784, 9 maio 2013.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994.

JUN, L.; QINGHUA, L.; SHICUI, Z. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 370-377, 2006.

KRASIL'NIKOVA, A. A.; TIKHOMIROV, A. M. Получение жизнеспособной молоди русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) при использовании криоконсервированной спермы и оценка поведенческих реакций у криопотомства. **Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya**, Moscou, v. 53, n. 4, p. 762–768, ago. 2018.

KRAUSE, J.; BUTLIN, R. K.; PEUHKURI, N.; PRITCHARD, V. L. The social organization of fish shoals: a test of the predictive power of laboratory experiments for the field. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 75, n. 4, p. 477-501, nov. 2000.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology and Behavior**, Amsterdã, v. 90, n. 1, p. 54–58, 30 jan. 2007.

MARDINI, C.V.; SILVEIRA, M.A.; BARENHO D.H.L. **Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura de Porto Alegre, 1981. (Documento ocasional n.4.)

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 472, p. 156–177, 1 abr. 2017.

MATTHEWS, J. L. *et al.* Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. **Zebrafish**, New York, v. 15, n. 3, p. 279–290, 1 jun. 2018.

MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, New York, v. 6, n. 3, p. 197-213, 1984.

MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, Amsterdã, v. 184, n. 2, p. 157–166, 3 dez. 2007.

MILLER, N. Y.; GERLAI, R. Shoaling in zebrafish: What we don't know. **Reviews in the Neurosciences**, Bâle, v. 22, n. 1, p. 17–25, fev. 2011.

NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, Amsterdã, v. 201, p. 84–92, 1 fev. 2019.

OLIVEIRA, R. F.; SILVA, J. F.; SIMÕES, J. M. Fighting zebrafish: Characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. **Zebrafish**, New York, v. 8, n. 2, p. 73–81, 1 jun. 2011.

PEIXES BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2020. **Associação Brasileira de Piscicultura**. São Paulo: Peixes BR, 2020.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 109-116, Fev. 2013.

POWERS, C. M. *et al.* Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 33, n. 6, p. 708–714, nov. 2011.

RAMBO, C. L. *et al.* Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **Physiology and Behavior**, Amsterdã, v. 171, p. 50–54, 15 mar. 2017.

RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification Effect of cryopreservation on genome View project. **Cryobiology**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 149-153, 2010.

ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 3, p. 508–516, 2013.

RURAL, C.; MARIA, S. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE) Biology of *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

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

SCHULZ, U. H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 2a, p. 565-574, 2006.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 12, p. 1551-1553, 1999.

- SHETTLEWORTH, S. J. Animal cognition and animal behaviour. **Animal Behaviour**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 277-286, 2001.
- SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. [S.l.]: Department of Zoology, University of Stockholm and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v.31, p. 231-243, 2000.
- THUNDATHIL, J. *et al.* Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. **International Journal of Andrology**, Hoboken, v. 22, n. 6, p. 366-373, 1999.
- TIERSCH, T. R. Cryopreservation in Aquarium Fishes. **Marine Biotechnology**, Heidelberg, v. 3, n. 0, p. S212–S223, 2001.
- TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of in vitro culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. **Theriogenology**, New York, v. 74, n. 2, p. 290–303, 2010.
- TUYTTENS, F. A. M. *et al.* Observer bias in animal behaviour research: Can we believe what we score, if we score what we believe? **Animal Behaviour**, Oxford, v.90, p.273-280, abr. 2014.
- WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 3, p. 661–672, 2007.
- WITECK, L. *et al.* Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de Jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 3, p. 477-481, 2011.

 <p>Sistema de Bibliotecas Universidade Federal do Rio Grande do Sul</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE AGRONOMIA BIBLIOTECA ANTONIO TAVARES QUINTAS</p> <p>BIBAGRO - SETOR DE ATENDIMENTO SERVIÇO DE NORMALIZAÇÃO</p>	 <p>Sistema de Bibliotecas Universidade Federal do Rio Grande do Sul</p>
<p style="text-align: center;">COMPROVANTE DE REVISÃO DE REFERÊNCIAS</p> <p>Nome completo: Diogo Rodrigues Araújo Curso/Programa de Pós-Graduação: PPG Zootecnia Orientador(a): Danilo Pedro Streit Jr. Data da Defesa: 28/03/2023</p> <p>Revisadas 80 referências conforme norma da ABNT – NBR 6023/2018:</p> <p>Importante: <i>A versão final da lista das referências deve ser incluída no arquivo final do trabalho.</i></p> <p style="text-align: right;">Elisângela Rodrigues Bibliotecária – CRB 10/1457 Porto Alegre, 05/06/2023</p>		

10. Vita

Diogo Rodrigues Araújo é natural de Viamão, no estado do Rio Grande do Sul, filho de Vladimir Fraga Araújo e Elieta Rodrigues Araújo. Ele concluiu o ensino médio no Colégio Stella Maris, em Viamão, e graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em Porto Alegre, em 2018. Após a graduação, ele ministrou aulas para o ensino básico do Estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Camaquã. Em 2019, iniciou como Técnico de Biotério no Centro de Modelos Biológicos Experimentais da PUCRS. No ano de 2021, ele iniciou sua Pós-graduação *strictu sensu* em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de produção animal e biotecnologias reprodutivas, fazendo parte do grupo de pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade de Espécies Aquáticas).