



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



**Programa de
Pós-graduação**
em Ecologia e
Conservação da
Biodiversidade

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CLARYCE CUNHA COSTA SOUSA

**VIABILIDADE DO USO DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS
DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) EXPOSTOS A
CIPERMETRINA**

São Luís – MA

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

**VIABILIDADE DO USO DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS
DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) EXPOSTOS A
CIPERMETRINA**

Documento de defesa de dissertação de Mestrado apresentado em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual do Maranhão.

Área de concentração e linha de pesquisa: Ecologia e conservação – Ecologia e conservação da biodiversidade de ambientes aquáticos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta

Coorientador: Prof. Dr. Jadson Pinheiro Santos

São Luís – MA

2024

Sousa, Claryce Cunha Costa.

Viabilidade do uso de espermatozoides criopreservados de *Colossoma macropomum*, (CUVIER, 1816) expostos a Cipermetrina/ Claryce Cunha Costa Sousa – São Luís (MA), 2024.

67f.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade) - Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, 2024.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta.

1. Peixe amazônico. 2. Motilidade espermática. 3. Bioensaio. 4. Piretróide
I.Título.

CLARYCE CUNHA COSTA SOUSA

**VIABILIDADE DO USO DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS
DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816) EXPOSTOS A
CIPERMETRINA**

Documento de defesa de dissertação de
Mestrado apresentado em cumprimento
às exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ecologia e Conservação
da Biodiversidade da Universidade
Estadual do Maranhão.

Aprovado em: __/____/

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



RAIMUNDA NONATA FORTES CARVALHO NETA
Data: 25/01/2025 14:44:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta (Orientador)

Doutora em Biotecnologia

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Documento assinado digitalmente



JONATAS DA SILVA CASTRO
Data: 15/01/2025 17:06:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jonatas da Silva Castro

Doutor em Aquicultura

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Documento assinado digitalmente



ERIVANIA GOMES TEIXEIRA
Data: 26/01/2025 10:07:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Erivânia Gomes Teixeira

Doutora em Engenharia de Pesca

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Documento assinado digitalmente



LIGIA ALMEIDA PEREIRA
Data: 23/01/2025 17:32:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lígia Almeida Pereira

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

*“Decida o que quer. Acredite que pode tê-lo.
Acredite que o merece e acredite que é possível!”
Rhonda Byrne – The secret.*

“Dedico este trabalho a todos os que incessantemente se comprometeram a colaborar na construção de cada passo, da elaboração ao resultado da pesquisa. Deixo o meu profundo agradecimento a Raimunda Fortes e ao Jadson Pinheiro Santos.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, o criador da vida e a todas as bênçãos e oportunidades que Ele me proporciona diariamente.

A minha família, em especial a minha mãe **Lúcia Elena** e meu esposo **Matheus Franke** que tanto me dão forças e motivação para eu seguir em frente mesmo quando o desânimo tenta me paralisar.

A **Universidade Estadual do Maranhão** pela formação e financiamento da bolsa de apoio científico.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB)** pelo embasamento científico e formação.

Aos **mestres e professores** do Programa de Mestrado pela partilha de conhecimento e auxílio no desenvolvimento das competências inerentes ao aluno pesquisador.

Meu agradecimento especial a minha querida amiga e orientadora **Professora Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta** que me acompanha desde 2015 na minha trajetória acadêmica (da graduação ao mestrado), sempre acreditando em meu trabalho e o quanto posso ir além.

Ao **Laboratório de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq)**, no qual faço parte e desenvolvo minhas pesquisas científicas.

Ao **Grupo de pesquisa em Ecotoxicologia e Monitoramento em Ambientes Aquáticos (GPEMAaq)** pela partilha de momentos de embasamento científico e colaboração nos projetos.

Ao meu Coorientador **Professor Dr. Jadson Pinheiro Santos** pela parceria nos trabalhos em campo, coletas, viagens, perrengues e escrita científica. Além das participações nos artigos (2021;2023) oriundos da tese de doutorado. Gratidão!

Ao **Laboratório de Ictiofauna e Piscicultura Integrada (LABIPI)** pelo acolhimento e fornecimento de materiais essenciais para o desenvolvimento dos trabalhos em campo e criopreservação das amostras.

Ao **Laboratório de Reprodução Animal do LAMP**, na pessoa do professor **Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior**, que forneceu o espaço algumas vezes para o descongelamento das amostras criopreservadas.

Ao meu querido amigo **Achilles Nina Santos Ferreira** pelo grande auxílio e

parceria nos trabalhos em campo, viagens, processamentos e análises dos materiais coletados. Você foi meu grande colaborador e eu sou muito grata por tudo amigo!

A **Beatriz Muniz**, discente da Engenharia de Pesca da UEMA e natural de Santa Rita (Ma), que também me ajudou bastante nas etapas de análise morfológica dos espermatozoides e descongelamento das micropalhetas. Você é muito especial!

Aos pescadores **Sr. Henrique da piscicultura Pai e Filho** no município de Santa Rita por fornecer o espaço e as matrizes para coleta de material biológico. Gratidão!

Ao **Tiago Santos**, Engenheiro de Pesca por me auxiliar com a avaliação dos dados abióticos das concentrações de cipermetrina e pelo uso do espaço do **Laboratório de Oceanografia e Microbiologia Aquática**. Obrigada!

Agradeço ao **Dr. Jonatas da Silva Castro** por ter aceito o convite para a banca de defesa de dissertação e contribuir ricamente com sugestões. Sou muito grata!

A professora **Dra. Erivânia Gomes Teixeira** por sua contribuição construtiva na avaliação da apresentação de qualificação e defesa. Agradeço de coração!

A professora **Dra. Lígia Almeida** por ter me acompanhado desde a graduação partilhando sempre o seu conhecimento sobre fisiologia. Obrigada!

A secretaria da pós-graduação na pessoa de **Fabiene Barros** por me auxiliar no processo de esclarecimento de dúvidas relacionadas a questões inerentes ao regimento do programa. Minha Gratidão Fabi!

RESUMO

Cipermetrina é um composto agrotóxico muito utilizado no combate de insetos em ambientes agrícolas e domésticos, mas seu uso indiscriminado e descartes inadequados das embalagens podem causar efeitos adversos aos animais que vivem em ambientes direta ou indiretamente afetados. Neste trabalho objetivou-se analisar a viabilidade do uso de espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em bioensaios ecotoxicológicos com cipermetrina. Foram utilizadas amostras seminais de machos de tambaqui sexualmente maduros. O sêmen fresco foi coletado oito horas pós indução hormonal em tubos de vidro graduados. Após avaliação inicial de ausência de ativação prévia foi realizado o experimento em esquema fatorial testando cinco concentrações de cipermetrina (2,5; 25; 125; 250 e 500 mg/L), sendo a motilidade avaliada pelo método subjetivo e os dados expressos em porcentagem de células móveis nas amostras por tempo em segundos. Foi avaliada a dose letal (DL50) a partir da ativação dos gametas até regredir em 50% de motilidade nas amostras; o tempo total de atividade foi registrado até 10% de células móveis (em segundos) após sua ativação inicial. Como controle, foi utilizada ativação com solução de NaCl a 0,9% e análise da motilidade da mesma forma descrita para a cipermetrina. Na etapa de criopreservação foi realizado o preparo das soluções crioprotetoras, com as concentrações 75% de glicose, 10% de DMSO, 5% de gema de ovo. Em seguida o sêmen foi colocado em micropalhetas e acondicionado em *dryshipper* com nitrogênio por até 20 minutos. Após a estabilização da temperatura, as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido a temperatura de -196°C. Para o descongelamento, as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e postas em banho maria a 60°C durante 8 segundos, transferidas para tubos plásticos e analisados. As análises do sêmen foram feitas em microscópio ótico e avaliada a viabilidade espermática por meio da ativação com a solução de NaCl. Após a confirmação da viabilidade pela análise da caracterização espermática, as amostras foram ativadas pelas concentrações de cipermetrina e estabelecida a taxa de motilidade subjetiva e o tempo de motilidade em triplicatas, levando em consideração a Dose letal (DL50) para cada repetição. Resultados apontam que as amostras *in natura* baseadas no método subjetivo apresentaram o tempo de

duração médio de 118 ± 12 segundos (considerando até 10% de motilidade espermática) e $95 \pm 5\%$ conforme o percentual de células móveis. A redução da motilidade espermática ocorreu de forma significativa ($p < 0,05$), principalmente na concentração de cipermetrina de 500 mg/L. Nas amostras descongeladas o tempo médio foi de $46,9 \pm 10$ segundos e sua taxa de motilidade $73,9 \pm 6\%$ para células móveis. A redução da motilidade foi mais intensa a partir da concentração 125mg/L, indicando o seu limite celular de tolerância ao inseticida. Os testes realizados demonstram que o sêmen de tabaqui é sensível ao processo de exposição aos resíduos de cipermetrina, podendo ser utilizado em bioensaios ecotoxicológicos.

Palavras-chave: bioensaio; peixe amazônico; motilidade espermática; piretróide.

ABSTRACT

Cypermethrin is a pesticide compound widely used to combat insects in agricultural and domestic environments, but its indiscriminate use and inadequate disposal of packaging can cause adverse effects on animals living in directly or indirectly affected environments. This work aimed to analyze the feasibility of using atabaque (*Colossoma macropomum*) sperm in ecotoxicological bioassays with cypermethrin. Seminal samples from sexually mature Tamaqua males were used. Fresh semen was collected eight hours after hormonal induction in graduated glass tubes. After an initial assessment of the absence of prior activation, the experiment was carried out in a factorial scheme, testing five concentrations of cypermethrin (2.5; 25; 125; 250 and 500 mg/L), where motility was evaluated by the subjective method and the data expressed in percentage of motile cells in samples per time in seconds. The lethal dose (LD50) was evaluated from the activation of the gametes until the motility regressed to 50% in the samples; total activity time was recorded to within 10% of motile cells (in seconds) after their initial activation. As a control, activation with 0.9% NaCl solution and motility analysis were used in the same way as described for cypermethrin. In the cryopreservation stage, cryoprotective solutions were prepared, with concentrations of 75% glucose, 10% DMSO, 5% egg yolk. The semen was then placed in microstrips and stored in a dryshipper with nitrogen for up to 20 minutes. After temperature stabilization, the samples were transferred to liquid nitrogen at a temperature of -196°C . For thawing, the samples were removed from liquid nitrogen and placed in a water bath at 60°C for 8 seconds, transferred to plastic tubes and analyzed. Semen analyzes were carried out under an optical microscope and sperm viability was assessed through activation with NaCl solution. After confirming viability through sperm characterization analysis, the samples were activated by cypermethrin concentrations and the subjective motility rate and motility time were established in triplicates, taking into account the Lethal Dose (LD50) for each repetition. Results indicate that in natura samples based on the subjective method presented an average duration of 118 ± 12 seconds (considering up to 10% of sperm motility) and $95\pm 5\%$ according to the percentage of motile cells. The reduction in sperm motility occurred significantly ($p < 0.05$), mainly at the cypermethrin

concentration of 500 mg/L. In thawed samples, the average time was 46.9 ± 10 seconds and the motility rate was $73.9 \pm 6\%$ for motile cells. The reduction in motility was more intense from the 125mg/L concentration onwards, indicating the cellular limit of tolerance to the insecticide. The tests carried out demonstrate that tambaqui semen is sensitive to the process of exposure to cypermethrin residues and can be used in ecotoxicological bioassays.

Keywords: bioassay; amazonian fish; sperm motility; pyrethroid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seleção e coleta das matrizes de peixes machos de tambaqui em piscicultura	35
Figura 2. Procedimento de indução hormonal em tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	37
Figura 3. Descongelamento das amostras de sêmen de <i>Colossoma macropomum</i> para análise espermática.	38
Figura 4. Anormalidades morfológicas dos espermatozoides de acordo com o protocolo de Maria <i>et al.</i> (2017).	39
Figura 5. Preparação das amostras de cipermetrina em laboratório....	41
Figura 6. Coleta do material biológico e análise da viabilidade do sêmen <i>in natura</i> de tambaqui	42
Figura 7. Resultados da motilidade espermática do sêmen <i>in natura</i> de <i>Colossoma macropomum</i> submetidos as concentrações de cipermetrina	45
Figura 8. Resultado da análise de redução da motilidade espermática subjetiva de <i>Colossoma macropomum</i> do sêmen <i>in natura</i> considerando o tempo de baixa atividade celular em DL50 por segundos.....	47
Figura 9. Motilidade espermática pelo método subjetivo (%) do sêmen de tambaqui descongelado e exposto a cipermetrina	51
Figura 10: Tempo de Motilidade espermática pelo método subjetivo (segundos) da dose letal de 50% dos espermatozoides do sêmen de tambaqui descongelado e exposto a cipermetrina	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos dados de sêmen *in natura* de *Colossoma macropomum* considerando a caracterização espermática dos indivíduos analisados 43

Tabela 2. Parâmetros de qualidade espermática do sêmen de tambaqui *C. macropomum* (média±desvio-padrão) *in natura* e descongelado.... 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1 Espécies de peixes em estudos ecotoxicológicos	20
3.2 Ecologia da espécie <i>C. macropomum</i>.....	22
3.3 Caracterização espermática de peixes	24
3.4 Criopreservação de gametas de peixes	27
3.5 Uso de cipermetrina em testes ecotoxicológicos e seus efeitos adversos em peixes 29	
4 MATERIAL E METÓDOS.....	34
4.1 Área de coleta e seleção das matrizes biológicas.....	34
4.2 Indução hormonal, extração e triagem do sêmen de <i>C. macropomum</i>	35
4.3 Criopreservação e descongelamento do sêmen de <i>C. macropomum</i>	37
4.4 Caracterização espermática das amostras de sêmen	38
4.5 Preparo da solução experimental com cipermetrina.....	39
4.6 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Avaliação do sêmen in natura de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) exposto a cipermetrina	41
5.2 Avaliação do sêmen criopreservado de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) exposto a cipermetrina.....	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A evolução dos sistemas produtivos utilizados pelo homem tem levado ao surgimento de efeitos crônicos em organismos vivos a partir da exposição a substâncias tóxicas, que são descartadas no ambiente natural, principalmente em organismos aquáticos como os peixes (Montana, Pimpão, 2012; Jindal; Sharma, 2019). Esses efeitos crônicos são observados principalmente na redução do crescimento, no comportamento reprodutivo e gerando neurotoxicidade e lesões histológicas em órgãos vitais (Cunha *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021). A grande causa de tais efeitos está associada à poluição crescente, que vai inserindo multiestressores ambientais (metais, biocidas, plásticos, nanomateriais, variações de temperaturas etc.) que afetam diretamente os organismos em estágios iniciais de vida os tornando vulneráveis a curto e longo prazo, causando patologias e/ou letalidade (Gallo *et al.*, 2020; Castro *et al.*, 2020).

Compostos químicos do tipo agrotóxicos, como a cipermetrina, podem comprometer a fertilização e os estágios de vida de organismos aquáticos, causando grande perda nos estoques e efeitos nocivos com alta mortalidade (Prusty *et al.*, 2015; Farag *et al.*, 2021). Parâmetros seminais podem ser alterados mediante a interação com os agentes tóxicos, como pH, osmolaridade, concentração, morfologia e cinética espermática (Singh, 2008). Essas substâncias afetam os padrões celulares dos gametas masculinos, causando redução da viabilidade das células espermáticas e a baixa fertilização (Pinheiro *et al.*, 2020).

Em termos de parâmetros biológicos, o sucesso reprodutivo é um fator crucial na determinação da sobrevivência de uma espécie, sendo registrado na literatura estudos com bioensaios ecotoxicológicos usando gametas e embriões de espécies aquáticas (Losso *et al.*, 2007; Fabbrocini *et al.*, 2012). Porém, diversas espécies de peixes, principalmente espécies nativas potenciais para o cultivo no Brasil como tambaqui (Morais; O'Sullivan, 2017), possuem mecanismos de reprodução que permitem esse evento apenas uma vez ao ano, no período da enchente dos rios; e em regiões quentes como norte e nordeste do Brasil, seu período de reprodução está restrito entre novembro e fevereiro (Vieira *et al.*, 1999; Maria *et al.*, 2011), da análise de alterações em seus aspectos

reprodutivos após exposição à contaminação (Santos *et al.*, 2021), fator que limita em muitos casos a sua disponibilidade para testes ecotoxicológicos de forma periódica (Fabbrocini *et al.*, 2012).

O peixe *Colossoma macropomum* é uma espécie sensível aos inúmeros impactos ambientais oriundos dos xenobióticos lançados em ambientes aquáticos contaminados, o que permite o uso dessa espécie para avaliação de estressores (Carvalho-Neta *et al.*, 2015). Alterações hematológicas, branquiais, hepáticas, genotóxicas e reprodutivas mostram a elevada sensibilidade desses organismos quando submetidos a situações adversas, seja por exposição mediante a ensaios toxicológicos em ambientes controlados ou por uma gama de elementos tóxicos disponibilizados no meio natural (Cunha *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019).

O uso constante de inseticidas piretróides para controle de pragas nas lavouras e no tratamento de ectoparasitas em animais de pasto tende a provocar efeitos adversos por meio do descarte inadequado e alto poder residual para muitos organismos sensíveis (Farag *et al.*, 2021). Muitas injúrias fisiológicas são causadas nos organismos pelo contato permanente com agrotóxicos, como: distúrbios endócrinos reprodutivos, genotoxicidade, estresse oxidativo, alteração na qualidade de gametas e no desenvolvimento embrionário de diferentes espécies de peixes dulcícolas (Santos *et al.*, 2021).

A cipermetrina é um agrotóxico sintético piretróide Tipo II (a- ciano) com alto poder de ação e de amplo espectro; inseticidas piretróides quando em contato com os peixes, atuam no sistema nervoso central atingindo os canais de sódio e se conectando com os receptores ácidos gama-aminobutírico (GABA) nos filamentos nervosos, causando uma série de patologias e distúrbios celulares (Montana; Pimpão, 2012; Prusty *et al.*, 2015).

Com o intuito de preservar os gametas masculinos de espécies aquáticas cultivadas ou afetadas por agentes xenobióticos, a criogenia do sêmen e de embriões de peixes é praticada em todo o mundo por diversos pesquisadores com muitas espécies da ictiofauna, sendo que espécies nativas amazônicas têm sido alvo de estudos para avaliação espermática (Maria *et al.*, 2012; Cunha *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2020, Medina-Robles *et al.* 2023). A criopreservação é uma técnica utilizada para preservar o material genético dos organismos para uso

imediatamente ou futuro, e conservar os estágios biológicos das células espermáticas, a sua forma e armazenamento é em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196 °C (Vasconcelos *et al.*, 2015). É indicada como alternativa segura para a redução de gastos com transporte e deslocamento de peixes adultos (Alavi *et al.*, 2019). Além disso, visa preservar a diversidade de espécies nativas, reduzindo os impactos de atividades antrópicas (principalmente resíduos agrícolas) no ciclo reprodutivo (Martínez- Páramo *et al.*, 2009; Maria *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2015).

O uso de técnicas de criopreservação do material genético do *C. macropomum* é relevante para conservar e proteger a espécie para futuras gerações, assim como outras espécies de peixes neotropicais (Oliveira *et al.*, 2007; Garcia, 2017), uma vez que o alto índice de poluição dos rios e dos ambientes de cultivo por substâncias químicas altamente letais, destina o táxon para um estado de alerta sobre sua conservação imediata (Montana; Pimpão, 2012). Esta espécie amazônica já tem sido utilizada em testes ecotoxicológicos para a avaliação das consequências fisiológicas que agrotóxicos causam em células espermáticas de peixes dulcícolas (Sigh, 2008; Santos *et al.*, 2023). Todavia, ainda existe a necessidade de pesquisas neste âmbito, por se tratar de uma espécie nativa sensível à contaminação e por apresentar grande apelo comercial, ecológico e econômico.

Nesse contexto, a pesquisa tem como hipótese que resíduos de cipermetrina podem alterar características da qualidade seminal em células espermáticas de tambaqui criopreservadas, podendo ser aplicado em bioensaios ecotoxicológicos. Esse tipo de abordagem será importante para contribuir com informações que possam nortear o uso desses piretróides no controle de pragas com foco na mitigação de perdas em atividades de agricultura e aquicultura (Farag *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2023). Diante do exposto, este estudo buscou analisar a viabilidade do uso de espermatozoides criopreservados de tambaqui *C. macropomum* em bioensaios ecotoxicológicos com cipermetrina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a viabilidade do uso de espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em bioensaios ecotoxicológicos *in natura* e criopreservado com o uso de cipermetrina;

2.2 Objetivos específicos

Analisar os padrões de motilidade em espermatozoides *in natura* e criopreservados de tambaqui expostos à diferentes concentrações de cipermetrina;

Identificar alterações espermáticas no sêmen *in natura* e criopreservado de tambaqui exposto à cipermetrina;

Avaliar o uso do sêmen *in natura* e criopreservado do peixe amazônico tambaqui *C. macropomum* exposto à cipermetrina.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Espécies de peixes em estudos ecotoxicológicos

Com a necessidade de monitorar os possíveis efeitos de substâncias tóxicas na biota aquática, diversos estudos em ecotoxicologia têm sido realizados com os peixes para avaliar o efeito da contaminação por produtos químicos com elevada toxicidade em diferentes níveis de organização biológica, integrando estudos que abordam estruturas celulares, indivíduos, populações e comunidades (Costa *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2020).

Com os avanços da ecotoxicologia aquática, a utilização de maneira aplicada dos bioensaios ecotoxicológicos em diversos estudos vem sendo realizados sobre a subletalidade em peixes avaliando as interações dos compostos existentes em águas residuais e os contaminantes tóxicos (Lins *et al.*, 2010). Por consequência disso, os peixes (organismos não-alvos) são vitimados pela ação dos produtos químicos e apresentam respostas fisiológicas alteradas em razão da bioacumulação dos resíduos, afetando assim a sua reprodução e consequentemente a sobrevivência (Cunha *et al.* 2018, Santos *et al.* 2023).

Estudos com a espécie *C. macropomum* representam alternativas para um melhor diagnóstico da interação e efeito de substâncias potencialmente tóxicas e do poder residual de agrotóxicos e suas consequências à sanidade reprodutiva desse organismo, como também estudos com o uso de biomarcadores hematológicos e genotóxicos mostram forte sensibilidade deste peixe a níveis significativos de contaminantes ambientais (Santos *et al.*, 2021; Carvalho-Neta *et al.*, 2015).

Essas sensibilidades são relatadas em vários estudos científicos descrevendo os efeitos colaterais do uso indiscriminado de agrotóxicos, como os inseticidas piretróides (Dawar *et al.*, 2016; Salako *et al.*, 2020; Georgieva *et al.*, 2021). A cipermetrina é bastante utilizada no combate das pragas nas lavouras e no uso doméstico para dedetização de mosquitos e baratas. Porém, são os resíduos em áreas agrícolas que tem gerado uma maior preocupação científica, por conta da lixiviação para corpos hídricos e interação com organismos não-alvos (Eni *et al.*,

2019).

Estudos recentes provam que o uso da cipermetrina provoca neurotoxicidade em peixes, assim como alterações enzimáticas e danos genotóxicos (Jindal e Sharma, 2019; Salako *et al.*, 2020). Além dos danos ao sistema nervoso, também são relatadas alterações nos espermatozoides de peixes submetidos a testes de toxicidade, implicando em dificuldades na fertilização e desenvolvimento larval (Ullah *et al.*, 2018; Kutluyer *et al.*, 2016).

Foram relatados efeitos adversos em espécies como o *Danio rerio*, onde constatou-se efeitos prejudiciais do pesticida beta-cipermetrina no desenvolvimento embrionário, assim como em *Clarias gariepinus* onde houve danos na saúde reprodutiva, bioquímica e fisiológica dos peixes expostos a cipermetrina (Wang *et al.*, 2017; Eni *et al.*, 2019). Na espécie *Salmo trutta fario* os efeitos adversos da exposição a deltametrina foram: danos aos tecidos das guelras e do fígado, efeitos neurotóxicos, distúrbios metabólicos, toxicidade na bioquímica sanguínea e distúrbios comportamentais como natação rápida, perda de equilíbrio e agressividade (Karatas *et al.*, 2019).

Na espécie *Channa punctata* foi relatado o estresse oxidativo e danos genotóxicos após os organismos serem expostos a concentrações de 0,4, 0,8 e 1,2 µg/L de cipermetrina por 48 e 72 horas de interação, assim como comprovado em *Danio rerio* da existência de genotoxicidade das células da retina e das células branquiais; dano por estresse oxidativo das células da retina e das células branquiais, bem como o aumento da atividade de SOD e CAT nos organismos (Ansari *et al.*, 2011; Paravani *et al.*, 2019).

Mudanças comportamentais também foram observadas em *Oreochromis niloticus* quando submetido a cipermetrina após testes até 96h de exposição na concentração de 5,99 µg/L (Sarıkaya *et al.*, 2009). A mesma espécie quando exposta a oito concentrações de belfetrina e de deltametrina durante 96h apresentou os seguintes efeitos tóxicos: natação errática, desequilíbrio e hiperventilação (Gil *et al.*, 2018). O comportamento de movimento errático foi presente no estudo de Andem *et al.* (2016) avaliando a espécie *Clarias gariepinus*, onde foi observada alterações locomotoras graves, em razão da perturbação provocada pela ação neurodegenerativa do agrotóxico.

A espécie *Anabas testudineus* passou pela análise hematológica após

exposição a substância piretróide tóxica, apresentando redução nos níveis de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem de trombócitos, redução da contagem de leucócitos (Babu Velmurugan et al, 2016).

Recentemente, estudos desenvolvidos por Santos *et al.* (2023) e Santos *et al.* (2021) apontam vários distúrbios fisiológicos causados nos peixes, isso pode estar acontecendo em razão do descarte incorreto e acúmulo de resíduos pela agricultura, peixes como o *Collossoma macropomum* podem ter suas funções reprodutivas comprometidas.

Estudos com a espécie *C. macropomum* representam alternativas para um melhor diagnóstico da interação e efeito de substâncias potencialmente tóxicas e do poder residual de agrotóxicos e suas consequências à sanidade reprodutiva desse organismo, como também estudos com o uso de biomarcadores hematológicos e genotóxico mostram forte sensibilidade deste peixe a níveis significativos de contaminantes ambientais (Santos *et al.*, 2021; Carvalho-Neta *et al.*, 2015).

Existem espécies de peixes amazônicos semelhantes ao tambaqui, a exemplo do jundiá (*Rhamdia quelen*) que é um peixe nativo da América do Sul muito utilizado em bioensaios ecotoxicológicos que por meio da avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, comportamentais e reprodutivos indicam o nível de tolerância do organismo à exposição aos contaminantes ambientais (Borges *et al.*, 2007; Bombardelli *et al.*, 2016).

Nessa perspectiva, estudos com peixes nativos, como o tambaqui *C. macropomum*, reforçam a importância de avaliar a ação dos xenobióticos e seus potenciais riscos a sua sanidade, sendo uma boa ferramenta em estudos de monitoramento ambiental (Castro *et al.*, 2015).

3.2 Ecologia da espécie *C. macropomum*

O peixe *Collossoma macropomum*, popularmente conhecido por tambaqui, é um serrassalmídeo pertencente a bacia amazônica e que é tido como um dos principais táxons nativos de interesse comercial na piscicultura brasileira (Lobo *et al.*, 2015; Morais; O`Sullivan, 2017; Gallego *et al.*, 2017). O tambaqui possui sua distribuição neotropical que abrange os rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes, sua taxonomia está categorizada no reino Animalia, filo

Chordata, na classe dos Actinopterygii, da ordem Characiformes e família Serrassalmidae. Em outros países como o Peru, é conhecido vulgarmente como gamitana, já na Venezuela e Colômbia onde também há sua ocorrência, é conhecido popularmente como cachama (Morais; O`Sullivan, 2017). Morfofisiologicamente, é um peixe redondo de corpo bem alto, é alongado e razoavelmente comprimido nas laterais durante a fase adulta; na bacia amazônica, principalmente no estado do Pará seu habitat é a foz do rio Xingu, e considerando que sua distribuição ocorre no médio rio Ucaiali, no Peru (Morais; O`Sullivan, 2017).

Apresenta-se como uma espécie de elevado interesse comercial, sendo o segundo maior peixe de escamas da bacia amazônica com o seu porte inferior apenas para *Araipamas gigas*, o pirarucu, que também é uma espécie endêmica da Amazônia (Silva, 2016). A desova para a espécie tambaqui é anual e total, e naturalmente, ocorre nos períodos de novembro a fevereiro, combinando-se a época das enchentes dos rios (Maria *et al.*, 2017) onde nas estratégias de reprodução irão realizar a migração do habitat de alimentação para o habitat reprodutivo (piracema), caracterizando-o como um peixe reofílico (Vieira *et al.*, 1999; Leite *et al.*, 2011).

Quanto à ecologia da espécie, Morais e O` Sullivan (2017) explicam que *C. macropomum* é: a) de hábito solitário; b) os adultos ficam em florestas inundadas durante os primeiros 5 meses de inundação e consomem apenas frutas e grãos; c) Jovens e juvenis vivem em águas negras de planícies de inundação até sua maturidade sexual; d) alimenta-se de frutos e nozes de palmeiras e seringueiras; e) na baixa estação de água, alimenta-se de fezes, peixes, algas, madeira, folhas e detritos; f) tem dentes fortes que podem mastigar nozes duras que caem na água durante a época de floração; g) os juvenis são onívoros.

Em condições de cultivo em pisciculturas, estes organismos são colocados em tanques a uma temperatura de 26 a 28°C, são alimentados com rações extrusadas e são mantidos em condições de aeração adequada e troca contínua de água (Maria *et al.* 2011; Sousa e Salles, 2015). Para a reprodução, as espécies são submetidas à indução à espermiacção por hormônios naturais ou sintéticos, normalmente os mais utilizados pelos piscicultores são o Extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e o Ovopel® – D-Ala6, Pro9 Net-mGnRH, que são

administrados na parte intraperitoneal do peixe (Araújo, 2012).

3.3 Caracterização espermática de peixes

Em peixes, a ativação do gameta assim como a motilidade, são fundamentais para a fertilização bem-sucedida e o subsequente desenvolvimento do embrião, essa etapa é baseada nos eventos fisiológicos específicos do espermatozoide (Andrade *et al.*, 2015). A ativação espermática é um processo em várias etapas induzido pelas camadas extracelulares do oócito, envolvendo modificações na morfologia e função; essas modificações permitem que os espermatozoides se tornem móveis, sejam bioquimicamente levados para o oócito, interaja com ele, ocorra a reação acrossômica e se conecte com a membrana plasmática do oócito (Andrade *et al.*, 2015; Gallo *et al.*, 2020).

No entanto, os espermatozoides dos peixes teleósteos como o tambaqui, não possuem acrossomo, onde o meio de interação com a membrana do oócito ocorre via micrúpila (Andrade *et al.*, 2015). Os gametas masculinos são compostos por um núcleo esférico com cromatina condensada, uma peça intermediária que pode variar de tamanho com ou sem canal citoplasmático e ter até dois flagelos (Alavi *et al.*, 2019; Castro, 2019).

Em *Colossoma macropomum*, os espermatozoides apresentam um formato de cabeça arredondada, que cobrem uma área de $5,92 \pm 0,55 \mu\text{m}^2$, além de uma peça intermediária com média de $2,90 \pm 0,52 \mu\text{m}^2$ e o flagelo de $29,84 \pm 1,63 \mu\text{m}$ de comprimento (Castro, 2019). Esses espermatozoides gerados nos túbulos seminíferos ficam imóveis, até que seja liberado na água, obtenha choque hiposmótico e seja ativado em um meio concentrado de sais (Alavi, Cosson, 2006; Dadras *et al.*, 2016).

A qualidade espermática é avaliada com base na capacidade dos espermatozoides de fertilizar os ovócitos ocasionando o desenvolvimento normal de embriões (Bobe; Labbé, 2010). A viabilidade e a fertilização estão correlacionadas à qualidade do zigoto originado, que por sua vez depende da saúde do oócito e do espermatozoide. Alguns estudos já confirmam uma estreita relação entre infertilidade e saúde dos gametas por meio das avaliações seminais (Budhwar *et al.*, 2017; Gallo *et al.*, 2020).

As avaliações seminais são metodologias bastante utilizadas para analisar a viabilidade de células espermáticas quando submetidas na indução hormonal para fins de criopreservação (Lenz, 2014; Dias-Filho, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2015; Pinheiro *et al.*, 2020). Para que se tenha uma boa avaliação do sêmen, alguns parâmetros são mensurados: motilidade espermática, volume seminal, pH, osmolaridade, concentração espermática e morfologia dos gametas (Maria *et al.*, 2011; Maria *et al.*, 2017).

As características espermáticas partem da investigação dos parâmetros que indicam a capacidade de fertilização dos indivíduos, estes incluem concentração de espermatozoides, motilidade, viabilidade e morfologia (Faustino, 2014). A motilidade dos espermatozoides facilita o seu deslocamento espiral em direção ao ócito e o processo subsequente de fusão das células reprodutivas; no entanto, a baixa motilidade dos gametas masculinos é considerada uma das principais causas da infertilidade em organismos machos (McLaren, 2012).

Os gametas masculinos de peixes teleósteos apresentam uma estrutura morfológica, cuja característica é um núcleo esférico com cromatina condensada e bastante homogênea, fossa nuclear, peça intermediária com tamanhos que podem variar com presença ou ausência de canal citoplasmático, além de um ou dois flagelos alongados (Alavi *et al.*, 2019). O axonema presente no flagelo, é o propulsor do movimento dos espermatozoides, em sua estrutura há várias mitocôndrias que vão auxiliar no fornecimento de energia cinética para o deslocamento e motilidade espermática (Gallego *et al.*, 2018).

Os espermatozoides com padrões normais de motilidade e boa cinética espermática quando quiescentes, não apresentam ondulações flagelares e seu aspecto é retilíneo e imóvel, quando ativadas pela energia proveniente das mitocôndrias da peça intermediária, as ondas são totalmente propagadas ao longo do flagelo, porém os comprimentos de ondas tornam-se menores e constantes, na fase intermediária da cinética do espermatozoide este movimento vai diminuindo gradativamente, já nos estágios tardios de motilidade, as ondulações são vistas como apenas uma ondulação se restringindo próxima a cabeça do gameta, indicando sua fase pré-inércia; no instante final, essas ondulações somem e o gameta se torna caracteristicamente sem nenhuma atividade (Alavi *et al.*, 2019).

A motilidade espermática é um parâmetro importantíssimo de qualidade que avalia compartimentos celulares responsáveis pela ativação da célula e permanência constante do movimento, nestes compartimentos celulares estão as mitocôndrias onde a membrana plasmática. As mitocôndrias são organelas essenciais na motilidade, pois armazenam a energia necessária para o batimento flagelar; o axonema presente no flagelo, é o propulsor do movimento dos espermatozoides (Gallego et al., 2018). Diante disso, a avaliação da motilidade espermática é um parâmetro indispensável para observar as condições de experimentos, como ativação, condições de armazenamento, diluição, pós-descongelamento e interações com substâncias tóxicas como neste estudo.

Anormalidades morfológicas no deslocamento dificultam os movimentos ondulares (flagelo dobrado, flagelo enrolado, flagelo fraturado, flagelo curto), na forma corpórea celular (macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, cabeça isolada) juntamente com defeitos genéticos específicos (Varela-Junior, 2012), podendo prejudicar a motilidade dos espermatozoides e conseqüentemente a eficiência da fertilidade (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006; Maria *et al.*, 2017; Alavi *et al.*, 2019; Miliorini *et al.*, (2011).

Estudos de Maria *et al.* (2017) destacam que a abordagem baseada na descrição das anomalias nos gametas de *C. macropomum* auxilia na interpretação de dados referentes aos danos causados por efeitos adversos de substâncias e a análise morfológica é um critério descritivo para diagnosticar injúrias, e se as células espermáticas estão viáveis para análise e testes. Dentre as características citada pelos autores estão: a cabeça destacada (que resulta no desprendimento da peça intermediária e flagelo da célula principal), macrocefalia (aumento do tamanho da cabeça do espermatozoide), microcefalia (redução do tamanho da cabeça do espermatozoide), cabeça degenerada (perda do conteúdo da célula, resultante na degeneração celular e perda total da função), peça intermediária degenerada (perda de mitocôndrias e da função de energia e batimento flagelar), cauda dobrada (torção no flagelo de modo que forme um ângulo de 90°), cauda enrolada (o flagelo se envolve em trono de si mesmo), cauda quebrada (fratura do flagelo em um dos pontos do seu comprimento), cauda curta (redução do tamanho do flagelo) (Maria *et al.*, 2010).

3.4 Criopreservação de gametas de peixes

Os métodos de conservação de sêmen podem ser realizados em duas formas de acondicionamento das amostras: o resfriamento e o congelamento (Salmito-Vanderley *et al.*, 2016). Esses métodos podem ser aplicados na intenção de manter uma boa viabilidade aos espermatozoides de peixes que estão sob condições de cativeiro adotados na reprodução artificial assistida (Carneiro, 2007).

O resfriamento consiste em uma técnica a curto prazo que pode prolongar a viabilidade espermática por horas ou dias e a temperatura das amostras fica em torno de 4° C (Pádua *et al.*, 2012). Esse resfriamento pode ser feito lentamente em um equipamento de alumínio contendo vapor de nitrogênio, chamado *Dry shipper*, onde no seu interior contêm revestimento de espumas e retêm de maneira uniforme o vapor, garantindo assim que as amostras passem por uma adaptação de temperatura contínua, sem um choque térmico intenso e com congelação gradativa (Carolsfeld *et al.*, 2003; Salmito-Vanderley *et al.*, 2014). A técnica tem como característica a redução da temperatura, a prevenção do desenvolvimento bacteriano e da desidratação da amostra, o fornecimento e a troca de gases com o meio (Salmito-Vanderley *et al.*, 2016; Carneiro, 2007).

O congelamento de células pode ser feito basicamente de duas formas, pelo uso do gelo seco na temperatura de -79°C (neve carbônica ou dióxido de carbono sólido, que conserva amostras a curto prazo) ou pelo nitrogênio líquido (conservação a longo prazo- meses a anos) por meio da biotécnica de criopreservação aplicada à temperatura de -196°C (Carneiro, 2007). Nesta temperatura, a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos são mantidas, conservando-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico, o que pode ser observado por meio dos estudos utilizando a criopreservação (Maria *et al.*, 2011; Medina-Robles *et al.*, 2023).

A criopreservação de espermatozoides tem sido utilizada cada vez mais no aprimoramento das técnicas de manutenção de amostras de peixes, onde o seu uso beneficia tanto a conservação do material genético celular e na redução de gasto com transporte quanto na finalidade comercial (Maria *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2022). Desse modo, a criopreservação é uma biotécnica que permite conservar as células espermáticas sob baixas temperaturas, de modo que

mantenha a sua viabilidade por um intervalo de tempo maior mediante as condições de armazenamento adequadas (Vasconcelos *et al.*, 2015).

Por outro lado, a exposição das células a temperaturas extremas pode provocar danos pela congelação instantânea, pois acontece a interrupção de reações bioquímicas, processos biológicos e físicos (Salmito-Vanderley *et al.*, 2012) e nesse sentido, é importante a utilização de substâncias crioprotetoras para auxiliar na proteção dos espermatozoides no processo de congelamento e descongelamento, mitigando assim injúrias resultantes das quedas abruptas de temperaturas (Vasconcelos *et al.*, 2015).

Na técnica de criopreservação, a conservação das amostras biológicas é possível pela adição de soluções crioprotetoras que permitem a manutenção do metabolismo celular latentes e/ou quiescentes. As soluções protetoras podem ser intracelulares e extracelulares, onde a solução intracelular mais utilizada em experimentos é o DMSO (dimetilsulfóxido), pois evita a formação de cristais de gelo no interior das células, permitindo maior viabilidade da amostra por longos períodos sem gerar crioinjúrias graves (Vasconcelos *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2022).

O dimetilsulfóxido é um álcool dipolar, capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas, sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas (Castro *et al.*, 2011). Além disso, é considerado atóxico e interage com as membranas celulares atravessando-as por meio da difusão (Murgas *et al.*, 2004).

A solução protetora extracelular bastante utilizada nas biotécnicas é a gema de ovo (Maria *et al.*, 2011), devido ao seu alto teor proteico da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e capacidade de aumentar a resistência dos espermatozoides contra o choque térmico, pois melhoram a motilidade, a integridade do acrossoma nos espermatozoides (quando há) e membrana plasmática da célula (Madeira *et al.*, 2013). Além disso, evitam o rompimento da membrana e reforçam a impermeabilidade celular (Vasconcelos *et al.*, 2015; Maria *et al.*, 2011).

Outra substância que também compõe os protetores celulares é a glicose ou solução glicosada que é utilizada também na composição dos agentes crioprotetores, pois atua como substrato de energia e atua na pressão osmótica

da célula (Lopes *et al.*, 2014). A glicose como agente diluidor é altamente eficiente nas concentrações de 5%, por ser uma solução estéril, que pode ser levada a campo e sem muitas complexidades para uso (Viveiros *et al.*, 2009). A glicose já foi utilizada com sucesso em trabalhos com *Brycon insignis* (Viveiros *et al.*, 2011), com *Piaractus brachypomus* (Nascimento *et al.*, 2010), *Prochilodus lineatus* (Viveiros *et al.*, 2009) e *C. macropomum* (Santos *et al.*, 2023).

Em razão das variações de temperatura no processo de congelamento e descongelamento das amostras, há uma redução da qualidade espermática e alterações nos perfis proteicos dos gametas, conseqüentemente afetando a fertilização (Murgas *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). Essa redução é de cerca de 50% da qualidade espermática quando o sêmen é criopreservado, e a partir disso o uso de crioprotetores externos também são necessários para garantir a estabilização e fixação da membrana externa dos gametas tornando-o impermeável e protegido durante o processo (Vasconcelos *et al.*, 2015).

O sêmen criopreservado ou in natura pode ser utilizado em testes para avaliar efeitos de agrotóxicos (Santos *et al.*, 2023), pois o cenário de crescente poluição e impactos na sobrevivência de espécies sensíveis direciona à necessidade de estudos voltados para a investigação de efeitos adversos causados pela exposição a substâncias tóxicas em animais aquáticos (Fabbrocini *et al.*, 2012). Nesse sentido, por meio dos testes ecotoxicológicos é possível verificar os possíveis danos de substâncias tóxicas que a exposição aguda e crônica podem causar às espécies sensíveis, como os peixes.

3.5 Uso de cipermetrina em testes ecotoxicológicos e seus efeitos adversos em peixes

O uso indiscriminado de substâncias tóxicas, principalmente os agrotóxicos, no setor agrícola gera bastante efeitos colaterais para a biota aquática, tornando-se altamente perigoso para organismos que não são alvo da aplicação (Prusty *et al.*, 2015). Os resíduos das substâncias que advêm dos compostos químicos escoam por meio da lixiviação causando uma série de distúrbios graves em organismos sensíveis (Montana e Pimpão, 2012).

Os compostos mais utilizados na aplicação de controle de pragas em

lavouras são determinados a partir dos principais grupos que fornecem efeito letal mais rápido aos agentes patogênicos. Esses grupos são: inseticidas, fungicidas e herbicidas (Savary *et al.*, 2019). Os inseticidas apresentaram 78% de presença nos estudos realizados por Santos *et al.*, 2021, onde a cipermetrina com 13% do grupo dos inseticidas aparece entre os derivados do grupo dos piretróides sintéticos, isso comprova o elevado potencial tóxico à sanidade dos organismos, principalmente na fisiologia reprodutiva que na maioria dos casos apresentam distúrbios endócrinos severos, alterações nas gônadas e diminuição da qualidade dos gametas.

A cipermetrina é um inseticida oriundo dos piretróides sintéticos, por sua vez advindos das piretrinas naturais, cuja substância está presente nas flores Crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* e *C. coccineum*) bastante tóxicos para insetos e infelizmente para organismos não-alvo (Gupta, 2018; Salako *et al.*, 2020). São compostos lipofílicos fotoestáveis ativos contra os insetos, embora seja inofensivo para aves e mamíferos, são danosos para espécies aquáticas (Farag *et al.*, 2021; Mendes *et al.*, 2019).

O uso de agrotóxicos de maneira irregular, pode afetar organismos não-alvos (como os peixes) alterando perfis comportamentais, neurofisiológicos, químicos e bioquímicos dos indivíduos. Esses piretróides Tipo II (a-ciano), como a cipermetrina, são neurotóxicos bem potentes que atuam diretamente no sistema nervoso central, levando a preocupação devido o seu alto poder residual (Prusty *et al.*, 2015; Georgieva *et al.*, 2021).

Em consequência disso, organismos aquáticos que tem contato com produtos tóxicos dessa natureza, tendem a ter distúrbios endócrinos reprodutivos bem severos. Um exemplo disso são os peixes, pois recebem concentrações significativas que provocam estresse e deficiências fisiológicas, principalmente no ciclo inicial e na sobrevivência dos indivíduos (Santos *et al.*, 2021).

No entanto, esses produtos químicos são derivados de piretrina e piretro extraídos naturalmente de flores de crisântemo, pertencente à família botânica Asteracea. Os subprodutos dos piretróides mais comuns são a cipermetrina, deltametrina e fenvalerato, com elevado poder de ação como inseticidas, porém bastante tóxico para alguns organismos, principalmente peixes (Prusty *et al.*, 2015; Salako *et al.*, 2020). Estudos com o peixe *C.*

macropomum submetido a concentrações de deltametrina em ensaios toxicológicos de CL50, ou seja, toxicidade aguda, mostrou respostas alteradas em brânquias e fígado sendo considerada muito tóxica aos peixes induzindo genotoxicidade e inflamações hepáticas e branquiais severas (Cunha *et al.*, 2018). Salako *et al.* (2020) comparou o potencial de ação de três agrotóxicos (deltametrina, cipermetrina e lambda-cialotrina) em *Poecilia reticulata*, onde a análise tóxica do perfil fisiológico do peixe guppy foi mais severo quando submetido a cipermetrina indicando que pequenas concentrações deste inseticida causam efeitos adversos em organismos aquáticos.

Quadro 1. Estudos ecotoxicológicos em peixes submetidos a agrotóxicos

Espécie de peixe	Doses de exposição	Efeitos adversos	Agrotóxico	Pesquisadores
<i>Colossoma macropomum</i>	6mg/L; 12 mg/L; 24 mg/L; 120 mg/L e 240 mg/L nos tempos 0, 30, 60 segundos.	Redução da motilidade espermática	Glifosato e Feniltrotiona	Santos <i>et al.</i> (2023)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1,025, 2,05 e 4,1 mg/L por 2 horas.	Danos aos espermatozoides e redução da motilidade espermática.	cipermetrina	Kutluyer <i>et al.</i> (2016)
<i>Clarias gariepinus</i>	25,50, 75, 100 e 125 ppm) por 96h.	alterações comportamentais (movimento errático)	cipermetrina	Andem <i>et al.</i> (2016)
<i>Clarias gariepinus</i>	0,07, 0,014, 0,028, 0,056 µg/L por 28 dias.	erosão e hemorragias das lamelas branquiais secundárias, necrose das células hepáticas e hiperplasia	cipermetrina	Eni <i>et al.</i> (2019)
<i>Danio rerio</i>	0,025, 0,125 e 0,750 mg/L por 24 h	Danos aos estágios de crescimento; desenvolvimento vascular anormal e atividades locomotoras comprometidas.	cipermetrina	Xu <i>et al.</i> (2018)
<i>Catla catla</i>	0,124 e 0,41 µg/L por 45 dias	Neurotoxicidade e baixa atividade da	cipermetrina	Jindal; Sharma (2019)

		AChE no cérebro.		
<i>Labeo rohita</i>	20% da CL50 (8,43 mg/L)	Aumento do estresse oxidativo nas larvas; deformidades no desenvolvimento inicial e mortalidade.	cipermetrina	Dawar <i>et al.</i> (2016)
<i>Poecilia reticulata</i>	CL50 de 29,12 μ g/L, 28,12 μ g/L, 27,16 μ g/L e 27,05 μ g/L nos períodos de exposição de 24, 48, 72 horas e 96 horas.	Mortalidade dos organismos submetidos a essas concentrações e nesses tempos.	cipermetrina	Salako <i>et al.</i> (2020)
<i>Heteropneustes fossilis</i>	0,02 ppm por 45 dias	Redução da motilidade espermática, inibição da síntese de ATP nas mitocôndrias e alterações histológicas nas gônadas,	cipermetrina	Singh e Singh (2008)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	31.4 μ g/L por 96 horas de exposição	Aumento das atividades de ALT, AST e transaminases como reação específica dos piretróides	cipermetrina	Velisek <i>et al.</i> (2006)
Várias espécies	Artigo de revisão	Distúrbios comportamentais, bioquímicos e reprodutivos	cipermetrina	Farag <i>et al.</i> (2021)
<i>Poecilia reticulata</i>	29,12 μ g/L, 28,12 μ g/L, 27,16 μ g/L, 27,05 μ g/L por 24, 48, 72 e 96h em CL50.	Mortalidade dos alevinos	cipermetrina	Salako <i>et al.</i> (2020)
<i>Cyprinus carpio</i>	0,03, 0,015 e 0,01 μ g por 96h de exposição	Brânquias (necrose, fusão lamelar e hiperplasia); Fígado (hiperemia, necrose, hipertrofia); bioquímica (aumento da	cipermetrina	Georgieva <i>et al.</i> (2021)

		CAT, diminuição da Glutathione redutase, diminuição da Glutathione peroxidase).		
--	--	---	--	--

Legenda: Revisão bibliográfica de estudos ecotoxicológicos em peixes.

Fonte: Autoria própria (2024)

Artigos de revisão bibliográfica sobre estudos ecotoxicológicos com descrição dos resultados de danos ultraestruturais e bioquímicos da cipermetrina com alevinos e peixes maduros de várias espécies ao longo do seu desenvolvimento foram realizados por Farag *et al.* (2021), Khafaga *et al.* (2020) e Ullah *et al.* (2018). Nessas publicações é destacado que a exposição direta do piretróide aos organismos aquáticos prejudica toda a sua fisiologia, levando os peixes a terem danos desde o desenvolvimento embrionário até injúrias severas em órgãos sensíveis. Nesses estudos de revisão é descrito que em Zebrafish (*Danio rerio*) a cipermetrina induziu genotoxicidade e estresse oxidativo, ocasionou malformações em rohu (*Labeo rohita*) em processo de crescimento, causou efeitos imunotóxicos em carpa comum (*Cyprinus carpio*), danos ao DNA e apoptose e alterações histológicas; causou toxicidade hepática em Catla (*Catla catla*) e neurotoxicidade e alterações apoptóticas no cérebro de *Catla catla* (Khafaga *et al.* 2020; Farag *et al.* 2021); foram observados a agitação das guelras, hiperatividade, intoxicação e dispneia. Reafirmando isso, distúrbios endócrinos são observados nos estudos de Santos *et al.* (2021), ao realizar também uma revisão sistemática de grupos de agrotóxicos, substâncias químicas, efeitos tóxicos aos peixes.

Quanto aos distúrbios reprodutivos e malformações, a cipermetrina assim como vários compostos que estão dentro do grupo dos agrotóxicos piretróides afetam de forma incisiva no atraso da síntese de proteína dos ovos em maturação, como a vitelonina e coriogenina nos peixes mais juvenis, assim como no *Danio rerio* causou efeitos tóxicos no processo do desenvolvimento da bexiga natatória, segundo Montana e Pimpão (2012) e Prusty *et al.* (2015). Os órgãos alvos foram rim, fígado, brânquias, testículos e ovários e as principais alterações histológicas em seus tecidos foram necrose, perda da granulosidade citoplasmática, alterações nos núcleos picnóticos, vacuolização do citoplasma

em filamentos branquiais e rim, degeneração do glomérulo, ruptura de células epiteliais, e principalmente danos ao ducto coletor e alterações nas lamelas ovígeras e desregulação endócrina nos peixes (Farag *et al.*, 2021; Prusty *et al.*, 2015).

Os peixes expostos a agrotóxicos reduzem a atividade de defesa bioquímica de importantes enzimas oxidantes como a catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatona-s-transferase e marcador de peroxidação lipídica, inclusive em espécies bastante consumidas como *Hoplias malabaricus* (Farag *et al.*, 2021). Os agrotóxicos são substâncias altamente carcinogênicas e genotóxicas causando anomalias nucleares diversas, dentre elas quebras de cromossomos e cromátides, fragmentação do DNA, alteração na replicação do DNA e mutações. Estudos apontam os efeitos imunotóxicos e a fragmentação do DNA de células do fígado e células das brânquias de *Cyprinus carpio* expostas a concentrações subletais de cipermetrina (Khafaga *et al.*, 2020; Soltanian; Fereidouni, 2017).

Diante desses fatos, é importante reforçar que a exposição prolongada ou por concentrações subletais gera excitação à membrana celular externa e ao sistema nervoso (Kutluyer *et al.*, 2016; Jindal; Sharma, 2019). Pois alguns piretróides tem efeitos adversos que atuam diretamente nos receptores ácidos gama-aminobutírico (GABA), nos filamentos dos nervos, como é o caso da cipermetrina (Farag *et al.*, 2021; Khafaga *et al.*, 2020). É por esse motivo que estudos como estes ressaltam a importância de se analisar a viabilidade de espermatozoides de tambaqui nos bioensaios ecotoxicológicos, discutindo os possíveis efeitos adversos de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e como afetam os organismos aquáticos.

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Área de coleta e seleção das matrizes biológicas

As atividades de coleta do sêmen *in natura* de tambaqui foram realizadas no período de reprodução para a espécie (novembro a fevereiro) em pisciculturas localizadas no município de Santa Rita - MA (03°08'37" S; 44°19'33" W) a 78 km de São Luís. Foram selecionados seis espécimes machos

de *C. macropomum* com peso corporal acima de 3kg, sexualmente maduros e que liberassem sêmen em resposta a leve pressão abdominal (Figura 1). Os animais selecionados foram pesados, identificados e transportados para tanques de concreto com água corrente à temperatura de 27 a 29° C na Piscicultura Pai e Filhos (MARIA *et al.*, 2011). Os experimentos foram conduzidos com a anuência do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Maranhão (CEUA/UEMA) sob licença 01200.002200/2015-06(449).

Figura 1. Seleção e coleta das matrizes de peixes machos de tambaqui em piscicultura



Fonte: Autoria própria (2023).

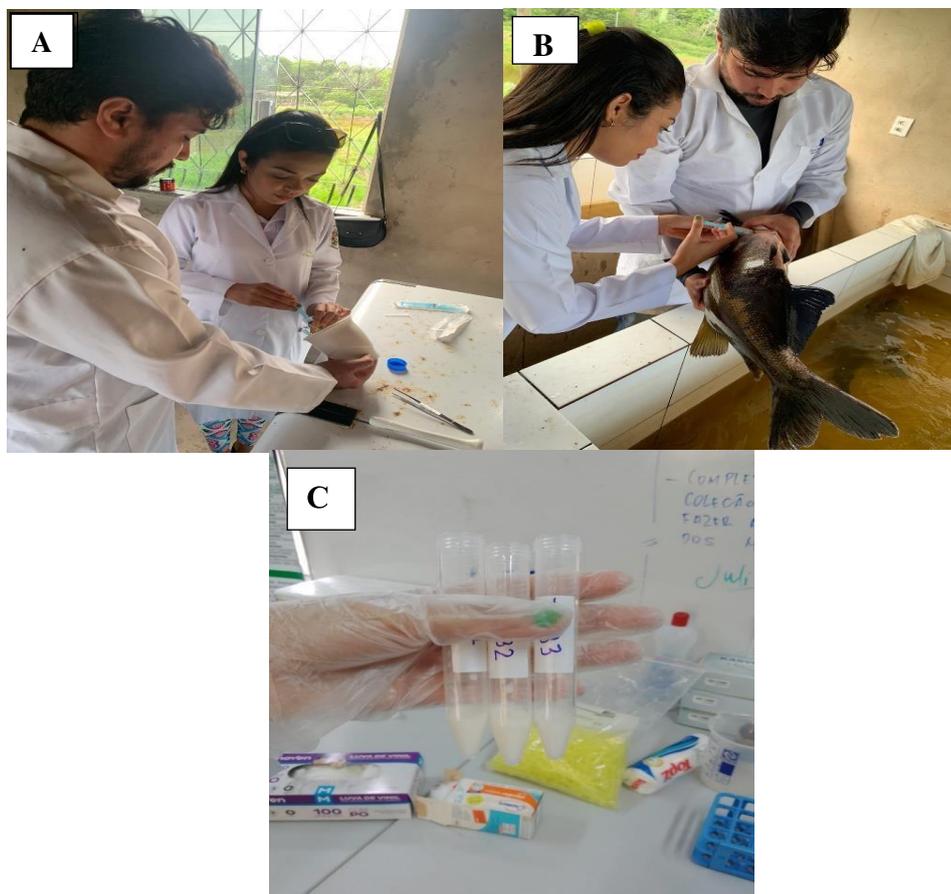
4.2 Indução hormonal, extração e triagem do sêmen de *C. macropomum*

Os peixes foram colocados em tanques com circulação constante de água e posteriormente foi realizada a indução hormonal utilizando Ovopel® – D-Ala6, Pro9 Net-mGnRH 2 mg.kg-1 de peso corporal de peixe vivo) (Araújo, 2012; Pinheiro *et al.*, 2016). Após 8 horas de indução hormonal, os peixes foram contidos e sua região urogenital foi limpa e seca com papel toalha para evitar contaminação (por água, muco, sangue, fezes e urina). Em seguida, foi realizada a coleta de sêmen em tubos de ensaio de vidro graduados. As amostras foram mantidas em caixa isotérmica com temperatura de 5°C (Maria *et al.*, 2011). Posteriormente, as amostras coletadas foram identificadas e analisadas em triplicatas individualmente no laboratório de manejo da piscicultura, onde 2 µL de sêmen de cada exemplar foi observado quanto à ausência de motilidade

espermática por meio de um microscópio de luz com o aumento de 400x. Após a confirmação da imobilidade dos espermatozoides, as alíquotas de 2 μL de sêmen de cada amostra foram ativadas com 100 μL de solução salina de NaCl 0,9% para caracterização inicial, observando-se a taxa de motilidade espermática subjetiva inicial e tempo de duração da motilidade, também sob microscópio óptico com aumento de 400x. Amostras com motilidade subjetiva acima de 80% foram consideradas viáveis para o experimento, conforme Santos (2013).

Na figura 2 são mostradas as etapas A, B e C que foram realizadas para a preparação da dose hormonal e a análise das amostras que foi realizada em campo logo após a coleta do sêmen. O uso de ovopel pelos piscicultores é bastante comum em substituição ao extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), uma vez que a indução por ovopel tem mostrado uma resposta positiva de acordo com Araújo (2012).

Figura 2. Procedimento de indução hormonal em tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: Autoria própria (2023).

Por ser um hormônio sintético as doses são administradas de forma mais assertivas, pois as composições já estão minimamente calculadas para evitar qualquer erro no estímulo fisiológico que venha a interferir na fertilização. Por outro lado, a hipófise é uma glândula presente naturalmente nos organismos, extraídos da carpa comum (*Cyprinus carpio*), o seu uso é para indução por meios de origem natural, a fim de não causar alterações hormonais indesejadas durante o efeito do hormônio dentro do período de estímulo no corpo, conforme adotado no protocolo de Maria *et al.* (2011) para *Collossoma macropomum*.

4.3 Criopreservação e descongelamento do sêmen de *C. macropomum*

As amostras de sêmen selecionadas foram criopreservadas de acordo com o protocolo proposto por Maria *et al.*, (2011) para o tambaqui. Alíquotas de sêmen foram diluídas na proporção 1:9 (sêmen:diluidor) em meio de congelamento composto por: 75% de glicose 277 mM + 10% de DMSO + 5% de gema de ovo. Após a diluição com solução glicosada, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, identificadas e permaneceram na temperatura ambiente por 20 minutos (tempo de equilíbrio). Em seguida as palhetas foram criopreservadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (*dry shipper*). Após um período de 2 horas para a estabilização da temperatura, as palhetas foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido e armazenadas a -196 °C até o momento do descongelamento. Na etapa do descongelamento (figura 3), o botijão de nitrogênio líquido foi aberto rapidamente e as amostras contidas nas palhetas (envoltas pela raque) no interior da caneca foram retiradas. Com o auxílio de pinças esterilizadas, as amostras foram mergulhadas em banho maria a temperatura de 60°C durante 8 segundos, e retirados com a pinças, cortados com a tesoura esterilizada, colocados em tubos de plástico eppendorf e numerados de acordo com a amostra envasada (Maria *et al.*, 2011; Santos, 2013).

Figura 3. Descongelamento das amostras de sêmen de *Collossoma macropomum* para análise espermática.

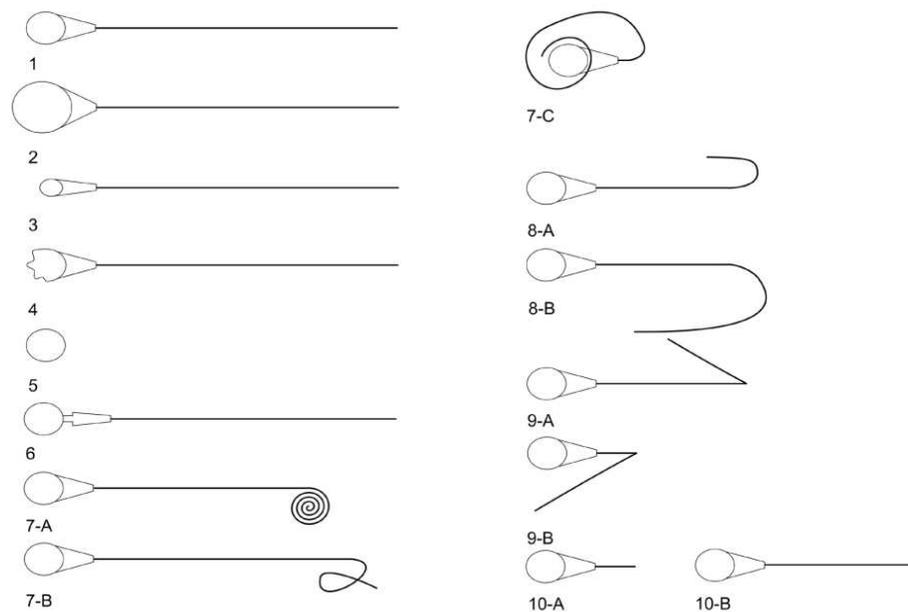


Fonte: Autoria própria (2024).

4.4 Caracterização espermática das amostras de sêmen

Em campo, os parâmetros seminais como volume (mL) e taxa de motilidade (pelo método subjetivo) foram avaliados. Após a fixação das amostras de sêmen de tambaqui em formol citrato (1 μL de sêmen para 999 de formol citrato armazenados em tubos eppendorf) em laboratório foi possível avaliar a concentração espermática ($\times 10^9$ espermatozoides. mL^{-1}) e alterações morfológicas nos espermatozoides (microcefalia, cabeça degenerada, cabeça isolada, peça intermediária degenerada, flagelo fraturado, flagelo enrolada, flagelo degenerada e cauda dobrada) conforme o protocolo proposto por Maria *et al.* (2017).

Figura 4. Anormalidades morfológicas dos espermatozoides de acordo com o protocolo de Maria *et al.* (2017).



Legenda: Principais alterações morfológicas nos espermatozoides de tabaqui. **1.** Espermatozoide normal; Alterações na cabeça: **2.** Macrocefalia. **3.** Microcefalia. **4.** Degenerada. **5.** Isolada normal. **6.** Peça intermediária degenerada; Alterações na cauda: **7.A-C.** Cauda enrolada. **8.A-B** Cauda dobrada. **9.A-B** Cauda Fraturada. **10.A-B** Cauda curta.

Fonte: Adaptado pela autora (2023).

Para análise da concentração espermática foi utilizado a câmara de Neubauer, de modo a realizar a conferência de células gaméticas em cada compartimento ou quadrículo da lâmina de forma diagonal, a totalizar a contagem de espermatozoides por lâmina (Sanchez *et al.*, 2011). Cada contagem foi feita em triplicatas para a mesma amostra considerando cada indivíduo de tabaqui analisado.

Para as alterações morfológicas foi utilizada lâminas de vidro histológicas devidamente higienizadas e colocadas por lâmina 3 μ L de sêmen e 3 μ L de corante rosa bengala feita a homogeneização e feito o esfregaço da lâmina com cuidado para não danificar a amostra para análise. Após essa etapa, a lâmina foi posta para secar e levada ao microscópio de luz. Com uma gota do óleo de imersão sobre a amostra e com a objetiva de 100x foi possível visualizar os gametas e suas alterações morfológicas. Posteriormente, foram contadas e registradas a quantidade de 500 células por lâminas em triplicatas por amostra. As alterações foram divididas por categorias conforme estudos de Maria *et al.* (2017) e os valores foram somados e tabelados para posterior tratamento dos dados.

4.5 Preparo da solução experimental com cipermetrina

As amostras de sêmen selecionadas foram mantidas sob refrigeração a 5°C para serem utilizadas como sêmen *in natura* (Maria *et al.*, 2011; Santos *et al.* 2023). Posteriormente, em triplicatas alíquotas de 2 μ l das amostras de sêmen passaram por exposição direta com ativação da motilidade espermática tendo como solução ativadora a cipermetrina 250 EC (250 g.L⁻¹) em 5 concentrações diferentes (2,5mg/L; 25mg/L; 125mg/L; 250mg/L e 500 mg/L) do agrotóxico (figura 5), e como solução ativadora controle, o NaCl (0,9% solução de soro

fisiológico). Foram feitas avaliações da motilidade espermática considerando o percentual de motilidade inicial, a dose letal (DL50) em função do tempo ao atingir 50% do período de motilidade dos espermatozoides e o tempo total de motilidade até 10% da atividade dos gametas.

Figura 5. Preparação das amostras de cipermetrina em laboratório.



Fonte: Autoria própria (2024).

4.6 Análise estatística

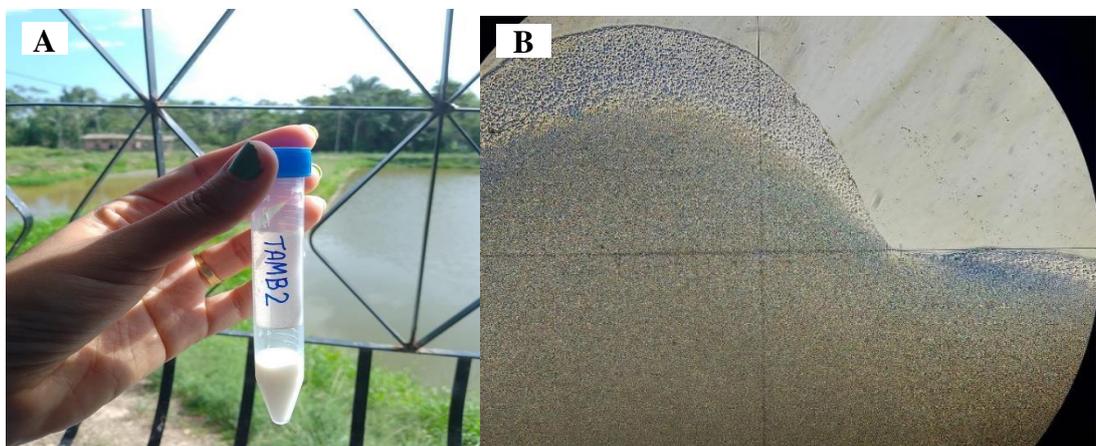
O delineamento experimental escolhido foi um teste fatorial. Foi realizada análise estatística por meio da avaliação de médias e desvios-padrão, a partir da qual foi obtido o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença observável entre os tratamentos, foi aplicado o teste Skot-knott, com nível de significância de 5% no programa estatístico SISVAR 5.7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do sêmen *in natura* de tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto a cipermetrina

As características do semên *in natura* como coloração, viscosidade e inatividade dos gametas analisados macro e microscopicamente indicaram que as amostras coletadas estavam viáveis para a execução dos testes ecotoxicológicos utilizando a cipermetrina (conforme indica a figura 6 A.B). Na etapa de ativação e análise da motilidade foi testada a ativação dos gametas de *Colossoma macropomum* na solução de NaCl (0,9% de soro fisiológico) em triplicatas, considerando 2 μL da amostra de sêmen fresco e 100 μL do ativador padrão, neste caso, o NaCl até atingir o percentual de 10% de células ativas na amostra analisada.

Figura 6. Coleta do material biológico e análise da viabilidade do sêmen *in natura* de tambaqui



Fonte: Autoria própria (2023).

Os valores do pH e temperatura das amostras de cipermetrina foram aferidos de acordo com as concentrações correspondentes ao estudo. Para 2,5 mg/L (pH 6.08; 27.1°C), 25 mg/L (pH 6.20; 27.2°C), 125 mg/L (pH 6.03; 27.1°C), 250 mg/L (pH 5.98; 27.6°C), 500 mg/L (pH 5.55; 27.9°C). A solução estoque composta por 100mL de cipermetrina e 9900 mL de NaCl apresentou pH=4.58, temperatura= 27.1°C e a solução de NaCl apresentou pH= 6.14,

temperatura= 27.8°C.

Na caracterização do sêmen *in natura* de *Colossoma macropomum*, quando a amostra atingiu o percentual de 10% de células móveis, observou-se que o tempo médio de motilidade foi de 118 segundos, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos dados de sêmen *in natura* de *Colossoma macropomum* considerando a caracterização espermática dos indivíduos analisados.

Característica do sêmen	Média±Desvio-padrão
Volume (mL)	2±1 MI
Concentração espermática	4,3±3,1 x 10 ⁹ espermatozoides/mL
Taxa de motilidade subjetiva	95±5%
Tempo de motilidade	118±12 segundos
Espermatozoides normais	91,6±4,4%
Cabeça isolada	1,0±0,5%
Cabeça degenerada	0,0±0,0%
Microcefalia	0,0±0,0%
Macrocefalia	0,0±0,0%
Peça intermediária degenerada	0,0±0,0%
Flagelo quebrado	0,2±0,1%
Flagelo dobrado	6,6±4,5%
Flagelo enrolado	0,5±0,3%

Flagelo fortemente enrolado

0,0±0,0%

Fonte: Autoria própria (2023).

A avaliação da taxa de motilidade subjetiva com o ensaio controle de solução salina de NaCl (0,9%) foi significativo quando comparado com as concentrações de cipermetrina, indicando que a qualidade espermática estava elevada. No entanto, quando o conteúdo seminal foi exposto as concentrações do agrotóxico, houve redução significativa no tempo de motilidade dos gametas, principalmente na concentração maior de cipermetrina (500 mg/L), indicando uma alta sensibilidade aos componentes do piretróide, pois na medida em que as concentrações foram aumentando, o tempo e o percentual de motilidade decaíram significativamente.

Em pesquisa realizada por Santos *et al.* (2023) testando cinco concentrações de dois agrotóxicos (glifosato e feniltrotona) em sêmen *in natura* de *Colossoma macropomum* (6mg/L; 12 mg/L; 24 mg/L; 120 mg/L e 240 mg/L), foram observados resultados similares ao presente estudo, onde a taxa de motilidade subjetiva foi de 91,7±2,9 (para o sêmen exposto ao ativador Macal), e para concentração espermática 5,0±1,2. O tempo de motilidade espermática observada neste estudo correspondeu a 118±12 segundos para o ensaio com NaCl (0,9%), o que indica um tempo aceitável para a espécie de acordo com estudos de Lenz *et al.* (2018), pois o tempo de motilidade total dos espermatozoides de *C. macropomum* em seu experimento variou de 98,5±31 a 158,3±133,7 segundos. Esses dados discutidos por Santos *et al.* (2023) e Lenz *et al.* (2018) corroboram com este estudo indicando que as amostras frescas estavam adequadas para os testes.

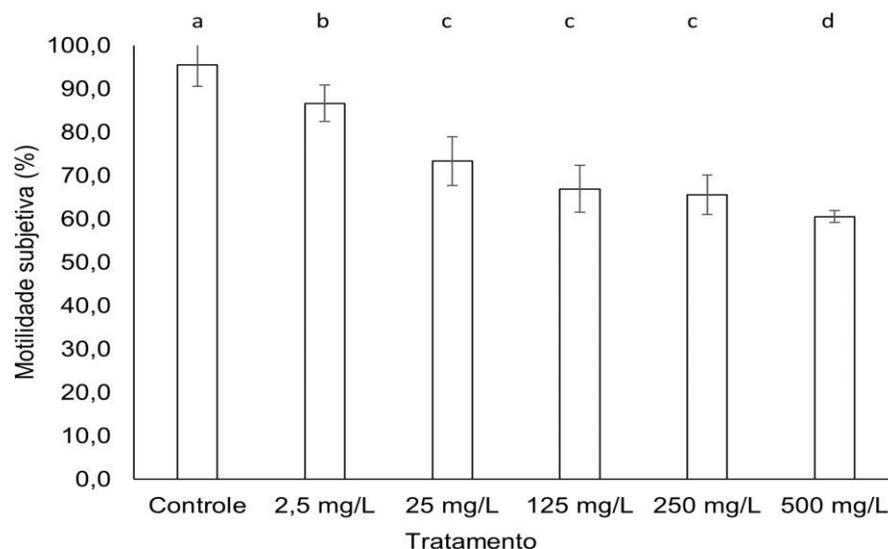
O baixo índice de anormalidades nos espermatozoides (tabela 2) indicaram que as amostras estavam viáveis e que as matrizes estavam nutricionalmente preparadas para possíveis eventos de reprodução assistida. De acordo com Maria *et al.* (2017), os espermatozoides podem apresentar deformações morfológicas de variados tipos, incluindo os que são mais frequentes em situações adversas às células. Essas anormalidades morfológicas podem ser classificadas como macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, cabeça isolada normal, peça intermediária degenerada, cauda enrolada, cauda

dobrada, cauda fraturada e cauda curta. No presente estudo, foram observadas algumas dessas anormalidades como cabeça isolada ($1,0\pm 0,5\%$), flagelo quebrado ($0,2\pm 0,1\%$), flagelo dobrado ($6,6\pm 4,5\%$) e flagelo enrolado ($0,5\pm 0,3\%$).

A caracterização morfológica das anormalidades é conceituada em cabeça isolada, que é uma condição em que o gameta se desvincula do flagelo, porém há integridade dos aspectos morfológicos normais; o flagelo quebrado é o rompimento celular ao longo da cauda; o flagelo dobrado é uma curva em diversos ângulos do espaço sem envolver a si mesmo ou a cabeça, e por fim, o flagelo enrolado que é o enovelamento da cauda em volta de si mesmo e da cabeça (Maria *et al.*, 2017). O percentual de alterações morfológicas recomendado em uma amostra seminal de tambaqui não deve ser maior que 35%, de acordo com este mesmo autor.

Na análise da motilidade espermática pelo método subjetivo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os tratamentos testados de cipermetrina em relação ao controle (Fig. 7). Os efeitos de redução da motilidade espermática intensificaram conforme o aumento da concentração do resíduo de cipermetrina, com maior intensidade na concentração de 500 mg/L.

Figura 7. Resultados da motilidade espermática do sêmen *in natura* de *Colossoma macropomum* submetidos as concentrações de cipermetrina.



Fonte: Autoria própria (2023).

Neste estudo foi observado a redução significativa da motilidade espermática à medida que as concentrações do agrotóxico foram maiores. A presença de biocidas como os piretróides, danificam a fisiologia dos gametas provocando alterações enzimáticas importantes na célula, como a peroxidação lipídica, a formação de espécies reativas de oxigênio, a redução da motilidade (como nesse estudo), fragmentação do DNA e baixa atividade mitocondrial mesmo em poucas concentrações dos agentes tóxicos (Gallo *et al.* 2020).

Kutluyer *et al.* (2016) avaliando os espermatozoides da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) submetidos a três concentrações de cipermetrina (1,025, 2,05 e 4,1 mg/L) por 2 horas, concluíram que os gametas foram altamente sensíveis a baixas concentrações deste piretróide, onde as doses subletais de cipermetrina afetaram significativamente a motilidade espermática.

A formação de espécies reativas de oxigênio em células reprodutivas expostas a esses agentes tóxicos, provoca alteração nos mecanismos de motilidade espermática levando a apoptose (Gazo *et al.*, 2013). Essa pode ser uma das consequências atreladas a interação dos inseticidas com as membranas celulares dos espermatozoides, conforme afirma Kutluyer *et al.* (2016).

Além dos danos bioquímicos e moleculares, a cipermetrina também altera outros aspectos dos sistemas biológicos dos peixes, como nos estudos de Andem *et al.* (2016) e Eni *et al.* (2019) que após 96 h de exposição de alevinos do bagre africano *Clarias gariepinus* a concentrações de cipermetrina (25,50, 75, 100 e 125 ppm) em 28 dias de exposição deste mesmo peixe em diferentes concentrações de cipermetrina (0,07, 0,014, 0,028, 0,056 µg/L), respectivamente, foram constatadas alterações comportamentais (movimento errático) e fisiológicas (erosão e hemorragias das lamelas branquiais secundárias, necrose das células hepáticas e hiperplasia) nos indivíduos.

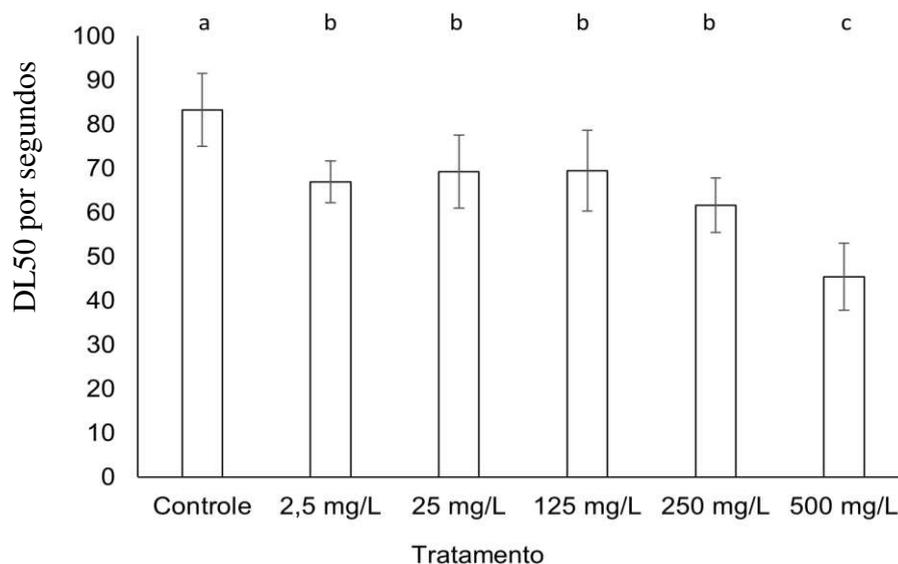
Em estudos de Xu *et al.* (2018) em experimento com cipermetrina no peixe zebrafish (*Danio rerio*) em diferentes concentrações (0,025, 0,125 e 0,750 mg/L) por 24 h, observaram alterações fisiológicas com implicação nos estágios de desenvolvimento do peixe, onde os mesmos apresentaram desenvolvimento vascular anormal e atividades locomotoras comprometidas.

Estudos utilizando biomarcadores neurotóxicos já citado por Amorim (2003) em órgãos sensíveis, também têm mostrado o resultado das

interações dos agrotóxicos em toda a fisiologia dos indivíduos. Jindal e Sharma (2019) por exemplo, relatam os efeitos neurotóxicos, histológicos e alterações apoptóticas em *Catla catla* quando submetido a ensaios de cipermetrina, onde os efeitos da exposição crônica ao agrotóxico induziram a diminuição da enzima acetilcolinesterase (AChE), causando deformidades da mielina, edema citoplasmático e dilatação mitocondrial. Essas alterações podem comprometer os impulsos nervosos que por sua vez interrompem as atividades normais para o bom funcionamento do cérebro podendo, inclusive, levar à morte.

Quando observada a DL50 (Fig. 8), relativo ao tempo em que houve redução da motilidade espermática subjetiva em pelo menos 50% das células espermáticas, constatou-se um tempo médio de 83 segundos para o tratamento controle contendo NaCl, sendo observada uma redução significativa desse tempo ($p < 0,05$) nos tratamentos contendo resíduos de cipermetrina, onde a maior redução foi observada também no tratamento com 500 mg/L.

Figura 8. Resultado da análise de redução da motilidade espermática subjetiva de *Colossoma macropomum* do sêmen *in natura* considerando o tempo de baixa atividade celular em DL50 por segundos.



Fonte: Autoria própria (2023)

O tratamento “Controle” mostrou que a dose letal (DL50) ocorreu

em 83 segundos. Para os tratamentos com as diferentes concentrações de cipermetrina (2,5mg/L, 25mg/L, 125mg/L e 250mg/L) os tempos de DL50 foram menores que aquele observado para o controle, embora não tenha sido observada diferença estatística entre si, exceto a concentração de 500mg/L que teve tempo inferior a 50 segundos.

A redução da motilidade é um indicador de que a energia dessas células estão se exaurindo e isso acontece de forma natural dentro do tempo considerado normal (Lenz *et al.*, 2018). No entanto, quando os espermatozoides são submetidos a condições adversas de interação como nesse caso, com as concentrações de cipermetrina, apresentam uma redução de motilidade muito maior e em um intervalo de tempo considerado inferior ao normal (Kutluyer *et al.*, 2016).

A presença de agrotóxicos em concentrações subletais leva a diferentes efeitos tóxicos em peixes. Dentre esses efeitos estão a toxicidade no desenvolvimento, como descrito para *H. Fossilis*; estresse oxidativo em *Danio rerio* e aumento do nível de cortisol, além de afetar os primeiros estágios de vida em *Labeo rohita* (Singh; Singh, 2008; Shi *et al.*, 2011; Dawar *et al.*, 2016).

Estudos como o de Ullah *et al.* (2018) comprovam que na medida em que as moléculas de cipermetrina interagem com as células, tecidos e órgãos, todo o seu sítio de ligação e estrutura funcional é afetado; por ser um inseticida neurotóxico, a primeira zona de ação são as células nervosas, onde esta interrompe o fechamento da entrada do canal Na⁺, gerando múltiplos impulsos nervosos ao invés de um só, o que leva a liberação de neurotransmissores como a acetilcolina e a estimulação de outros nervos. A cipermetrina tem efeito direto nos canais de cálcio levando ao aumento de cálcio citosólico, provocando a genotoxicidade e a citotoxicidade (Kaviraj; Gupta, 2014; Prusty *et al.*, 2015).

Essa toxicidade na célula inibe o receptor GABA, causando convulsões e excitabilidade nos indivíduos; Além disso, a cipermetrina inibe a AChE o que resulta na retenção prejudicial da Ach nos intervalos sinápticos (Idris *et al.*, 2012). Quando a cipermetrina é metabolizada, são gerados compostos como a cianidrina, os aldeídos e cianetos. Os cianetos e aldeídos geram as espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez afetam a adenosina trifosfato (ATP), prejudicando a sanidade do organismos intoxicados

(Ullah *et al.*, 2018). As espécies reativas de oxigênio (produto da reação dos cianetos com os aldeídos), induzem a peroxidação lipídica, e a concentração excessiva de Ca⁺ gera citotoxicidade (Ullah *et al.*, 2015). Nas mitocôndrias, o efeito da cipermetrina provoca disfunção, como a alteração do proteoma mitocondrial, o estresse oxidativo, a apoptose e consequentemente a neurodegeneração (Agrawal *et al.*, 2015; Salako *et al.*, 2020).

Em células espermáticas, a presença de cipermetrina por ser um inseticida lipofílico (Khafaga *et al.*, 2021), ultrapassa a membrana do flagelo e interage diretamente com o conteúdo interno, onde estão as mitocôndrias que geram energia para a motilidade celular (Ullah *et al.*, 2018). Essa interação tóxica afeta o batimento flagelar por interromper a produção de ATP e consequentemente paralisa o flagelo, que por sua vez impede o espermatozoide de se deslocar comprometendo assim a motilidade espermática e a fertilização (Ling *et al.*, 2008; Singh, 2008).

Alternativas estudadas pelos pesquisadores para evitar uma queda nas atividades de reprodução e fertilização envolvem o uso de biotécnicas de criopreservação das células espermáticas, pois a motilidade, concentração e alterações morfológicas são fatores determinantes na avaliação da qualidade dos espermatozoides (Martinez *et al.*, 2010; Streit Jr *et al.*, 2014).

5.2 Avaliação do sêmen criopreservado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto a cipermetrina

O sêmen de *Colossoma macropomum* criopreservado quando descongelado, apresentou características viáveis para a etapa de avaliação da motilidade espermática nos testes ecotoxicológicos com a cipermetrina, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de qualidade espermática do sêmen de tambaqui *C. macropomum* (média±desvio-padrão) *in natura* e descongelado.

Parâmetro	<i>In natura</i>	Descongelado
Volume (mL)		2±1mL
Taxa de Motilidade subjetiva (%)	95 ±5 4,3±3,1	73,9±6 -
Concentração espermática	118±12	46,9±10

(spz x 10⁹.ml⁻¹)

Tempo de motilidade (s)

Morfologia espermática (%)		
Espermatozoides normais	91,6±4,4	76±7
Cabeça isolada	1,0±0,5	1±1
Cabeça degenerada	0,0±0,0	1±1
Microcefalia	0,0±0,0	0±0
Macrocefalia	0,0±0,0	1±1
Peça intermediária degenerada	0,0±0,0	0±0
Flagelo dobrado	6,6±4,5	13±4
Flagelo enrolado	0,5±0,3	2±2
Flagelo fortemente enrolado	0,0±0,0	2±1
Flagelo fraturado	0,0±0,0	3±1
Total de anormalidades	8,1±5,3	23±11

Fonte: Autoria própria (2023)

A preservação das características celulares intactas pós-descongelamento, como apresentadas na tabela, indica que os espermatozoides para atingir a fertilização com sucesso precisam apresentar resistência celular. Nesse aspecto, é possível que os espermatozoides possuam atributos que lhes permitam prevenir danos e desenvolver resistência à criogenia durante o congelamento (Kopeika; Kopeika, 2007).

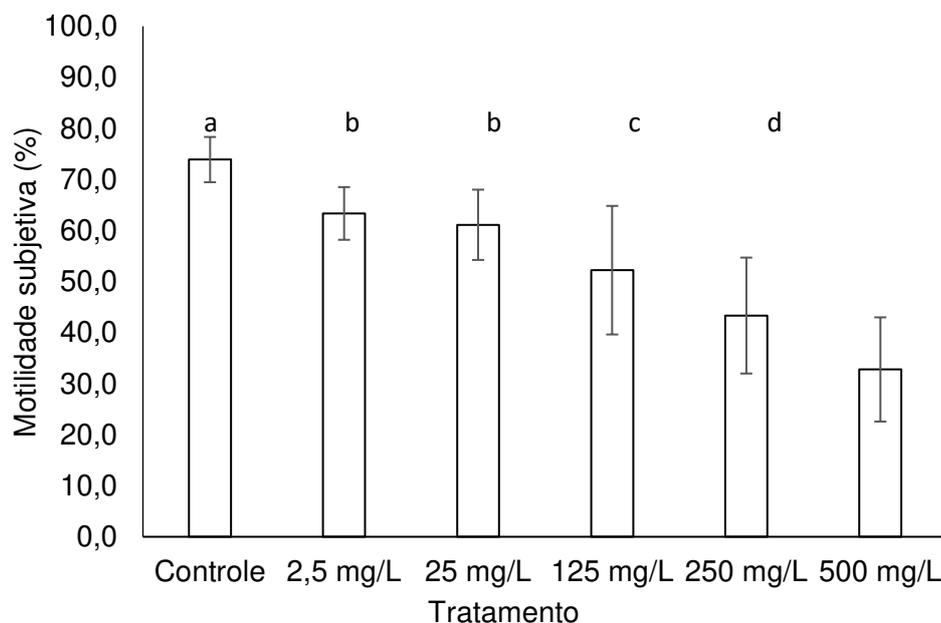
Além disso, existem outros fatores externos que também podem proteger o espermatozoide e garantir a eficiência fertilizante do esperma, como a presença dos agentes crioprotetores que auxiliam na proteção da membrana celular e na prevenção da formação de cristais de gelo no interior da célula (Martinez *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2015).

A ativação da motilidade espermática em espécies de peixes com fertilização externa ocorre pelas mudanças iônicas e pela osmolaridade que acontece quando os espermatozoides entram em contato com a água uma vez liberada no processo de reprodução (Linhart *et al.*, 2002). Em condições

experimentais, essa motilidade pode ser ativada pela presença de ativadores que possuam sais e promovam o choque osmótico, como por exemplo a solução salina de NaCl (Maria *et al.*, 2011), conforme adotado neste estudo.

Os resultados das análises dos espermatozoides de *Colossoma macropomum* (figura 9), indicaram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de motilidade nos tratamentos com exposição do sêmen descongelado à cipermetrina em relação ao controle (NaCl), com maior redução da motilidade, a partir das concentrações de 125 mg/L.

Figura 9. Motilidade espermática pelo método subjetivo (%) do sêmen de tambaqui descongelado e exposto a cipermetrina.



Fonte: Autoria própria (2023)

De acordo com o protocolo de Maria *et al.* (2011) para o sêmen criopreservado de *C. macropomum*, o percentual aceitável para considerar as amostras viáveis nos estudos após o descongelamento é de até 50% da motilidade espermática pela ativação com soluções salina. Neste estudo, a taxa de motilidade pela ativação de NaCl foi de 74 %, se mostrando superior ao valor mínimo citado pelo protocolo metodológico. As concentrações 250mg/L e 500mg/L apresentaram valores significativos de baixa motilidade espermática subjetiva.

A redução das taxas de motilidade do sêmen de *Colossoma*

macropomum mediante o aumento das concentrações do piretróide expressa a alta sensibilidade dos gametas aos componentes de cipermetrina, pois considerando uma escala de motilidade espermática padrão segundo McMaster *et al.* (1992) *apud* Singh e Singh (2008), os autores estabelecem percentuais comparativos que determinam essa escala cinética em: a) Motilidade muito fraca - 0 a 20% dos espermatozoides movendo-se lentamente no campo de visão; b) Má motilidade - 20 a 40% dos espermatozoides movendo-se rapidamente no campo de visão; c) Boa motilidade - 40 a 60% dos espermatozoides movendo-se rapidamente no campo de visão; d) Motilidade muito boa - 60 a 80% dos espermatozoides movendo-se muito rapidamente no campo de visão; e) Excelente motilidade - 80 a 100% dos espermatozoides movendo-se muito rapidamente no campo de visão, corroborando com esse estudo na avaliação da sensibilidade dos gametas ao inseticida.

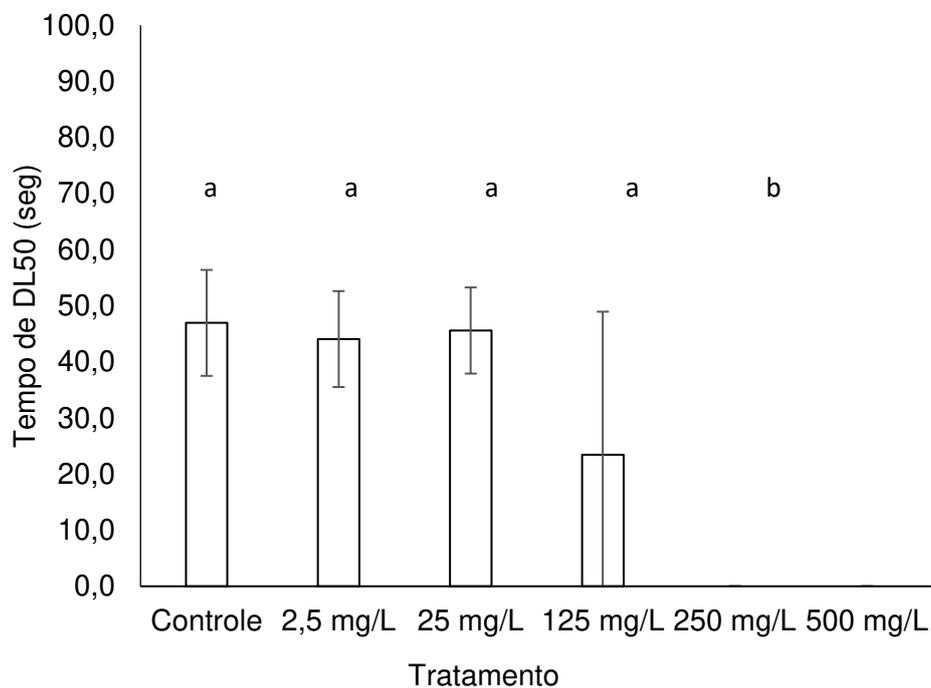
A redução da motilidade espermática é comum quando se trata da interação dos gametas com substâncias tóxicas, assim como no experimento de Bombardelli *et al.* (2016) que submeteu os espermatozoides de *Rhamdia quelen* sob influência de água contaminada por cobre, onde seus resultados afirmam que houve comprometimento da fertilização e da taxa de eclosão dos indivíduos expostos. Ling *et al.* (2008), realizaram um teste comparativo com dois inseticidas, o fenvalerato e a cipermetrina, onde os espermatozoides de rato foram expostos *in vitro* às concentrações de 1, 4, 16 e 64 $\mu\text{mol/L}$ no tempo de 1, 2 e 4 h. Os resultados indicaram que houve redução da motilidade espermática para os dois tratamentos, porém, a cipermetrina causou um efeito mais severo e imediato aos gametas, determinando assim o seu alto nível de toxicidade as células espermáticas do rato.

Essas informações auxiliam na análise da cinética espermática dos peixes, uma vez que a avaliação das amostras pelo método subjetivo de motilidade é eficaz em investigar o nível de tolerância em que os gametas suportarão a interação com o agrotóxico. Na avaliação da motilidade considerando o tempo de resistência dos gametas ao piretróide, é possível observar uma rápida redução da cinética celular em um curto espaço de tempo, conforme indicado na figura a seguir.

No presente estudo, quando comparou-se as cinco concentrações de

cipermetrina (Fig.10) observou-se que na medida em que as concentrações foram maiores a redução da taxa de motilidade foi percebida, principalmente a partir de 125 mg/L.

Figura 10: Tempo de Motilidade espermática pelo método subjetivo (segundos) da dose letal de 50% dos espermatozoides do sêmen de tabaqui descongelado e exposto a cipermetrina.



Fonte: Autoria própria (2023)

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores do tempo de motilidade da dose letal em 50% dos espermatozoides até a concentração de 125 mg/L, não sendo possível estipular a DL50 nos tratamentos 250 e 500 mg/L devido ao fato de a motilidade espermática subjetiva inicial ter sido inferior a 50% nos respectivos tratamentos.

Em muitas espécies, o influxo de Ca^{2+} e o efluxo de K^{+} ou Na^{+} através de canais iônicos específicos alteram o potencial de membrana e eventualmente levar a um aumento na concentração de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) na célula, o que pode constituir um sinal de iniciação para a motilidade espermática (Alavi et al., 2019). Nesse sentido, o uso do

cloreto de sódio como ativador é importante para sinalizar a motilidade (Maria *et al.*, 2011; Medina- Robles *et al.*, 2023).

Os meios que são hiper e hipo-osmóticos em relação ao fluido seminal provocam a motilidade espermática em peixes marinhos e de água dulcícolas, respectivamente. A motilidade dos espermatozoides dos peixes é mantida por meio da sua sensibilidade à osmolalidade e às concentrações de íons. Este mecanismo está relacionado às atividades dos canais iônicos na membrana e subsequentemente controla os mecanismos de motilidade dos axonemas, a parte contrátil dos flagelos (Cosson, 2010).

A atividade rápida de ativação dos gametas masculinos pelas concentrações de cipermerina associado ao processo de cinética veloz, provocou a instantânea resposta de redução do tempo de motilidade, pois essa condição requer um alto consumo de energia pelos espermatozoides, levando assim à brevidade do período móvel (Cosson *et al.*, 1999; Cosson, 2010), nesse caso corroborando com a toxicidade aguda causada pelo inseticida no bioensaio.

O processo de criogenia pode causar algumas alterações bioquímicas no espermatozoide após o descongelamento, como por exemplo, a peroxidação lipídica que consiste na reação em cadeia dos ácidos graxos polinsaturados da membrana plasmática por ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), alterando a integralidade, fluidez e permeabilidade dessas membranas (Salmito-Vanderley *et al.*, 2016).

No estudo de Medina-Robles *et al.* (2023) com *Piaractus orinoquensi* com sêmen criopreservado pelo tempo de 07 anos, considerado muito tempo nesse estudo, conservou sua capacidade fertilizante com valores próximos aos obtidos com sêmen fresco. Assim, essa técnica pode ser considerada segura e útil na melhoria da reprodução de espécies, que tem sido aperfeiçoada com o uso de crioprotetores e tem permitido uma utilização do sêmen a longo prazo.

Singh e Singh (2008), em estudos com o bagre *Heteropneustes fossilis* constatou que a cipermetrina induziu a redução da motilidade espermática em razão da inibição da síntese de ATP nas mitocôndrias presentes no flagelo. Cada animal possui características fisiológicas e genéticas que auxiliam na determinação da sua resistência em respostas a fatores estressantes

(Gallo *et al.*, 2020). Neste caso, os gametas descongelados que foram submetidos às concentrações do agrotóxico não resistiram por muito tempo à exposição contendo as soluções de cipermetrina.

Por ser um inseticida piretróide sintético advindo de piretrinas naturais, a cipermetrina é lipofílica e fotoestável, e age diretamente no sistema nervoso dos insetos (Prusty *et al.*, 2015; Khafaga *et al.*, 2021). Por apresentar essa característica lipofílica, é capaz de interagir e atravessar as camadas lipídicas de organismos não-alvo como os peixes (Montana; Pimpão, 2012), que possuem tecidos muito permeáveis e com alta absorção (brânquias e pele), que facilitam a entrada de substâncias químicas do meio externo (Rodrigues *et al.*, 2018). Desse modo, as células reprodutivas, como os espermatozoides, possuem em sua estrutura biológica a presença de membrana celular composta por fosfolipídeos (Alavi *et al.*, 2019). O agrotóxico por ser lipofílico atravessa as barreiras lipídicas da membrana celular alcançando o interior da célula, prejudicando assim a sua motilidade e metabolismo de modo geral (Kutluyer *et al.*, 2016; Cosson, 2010).

As substâncias crioprotetoras nas células criopreservadas evitam a formação de cristais de gelo e protegem a membrana da lise celular pela exposição a altas temperaturas do congelamento, porém quando os gametas são ativados pela cipermetrina, a simples presença das substâncias crioprotetoras externas não impedem a interação do agrotóxico com a célula espermática provocando um alto índice de letalidade por contato com o agente tóxico (Salmito-vanderley *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2015).

Dawar *et al.* (2016) testando pequenas concentrações (20% cipermetrina por 100L e água) de cipermetrina observaram que esse agrotóxico afetou a ontogenia de peixes *Labeo rohita*, causando a morte de embriões, induzindo ao estresse oxidativo, aumento da reação da peroxidação lipídica. Outros organismos também foram testados, como em estudos de Zhu *et al.* (2023) com a espécie de minhoca *Amyntas corticis* exposta a concentrações residuais de cipermetrina; nesse estudo, as avaliações da interação apontaram que a capacidade reprodutiva foi comprometida, principalmente a viabilidade espermática e degradação das atividades enzimáticas do sistema endócrino deste anelídeo, que por sua vez desempenha um papel ecológico importante para o

solo.

Vanzetto (2016) realizou testes com a espécie *Physalaemus gracilis*, um anfíbio da família Leptodactylidae, sendo observada que a exposição aguda a cipermetrina apresentou mortalidade total de 35% dos 104 indivíduos avaliados. Gradativamente, nas primeiras 24 horas ocorreu 25,6% (77) da mortalidade; as concentrações de 6 e 7 mg/L representaram 76,5% da mortalidade nas primeiras horas de exposição. Posteriormente, após 96 horas de exposição, concentrações como, 0,1 mg/L e 1 mg/L, apresentaram elevada mortalidade, 9,5% (10) e 16,2% (17) dos indivíduos considerando o percentual de exposição e o número de indivíduos mortos.

Salako *et al.* (2020) em seus bioensaios de toxicidade aguda utilizando três agrotóxicos piretróides (Cipermetrina, deltametrina e Lambda-cialotrina) com peixes guppy (*Poecilia reticulata*) relataram que a cipermetrina foi 1,16 e 3,02 mais tóxica aos peixes do que a deltametrina e a Lambda-cialotrina, provando dessa forma que pequenas concentrações deste agrotóxico são altamente danoso aos organismos aquáticos, gerando perda econômica ao causar grande mortalidade de peixes.

Xiang *et al.* (2019) em estudos de exposição crônica ao piretróides cis-bifentrina em zebrafish (*Danio rerio*) observaram que dentro do prazo de 60 dias de experimento a doses pequenas como 0, 20, 100 e 500 ng/L causaram distúrbios endócrinos reprodutivos nos organismos, dentre as alterações presentes é relatada a diminuição da desova, atrasos no desenvolvimento dos testículos e ovários gerando redução da fecundidade. Além disso, houve redução significativa da taxa de motilidade total dos espermatozoides conforme corrobora com o nosso estudo com cipermetrina para este parâmetro de avaliação seminal.

Han *et al.* (2012) descrevem os efeitos do endossulfan no crescimento, reprodução, vitelogenina e histologia do zebrafish adulto (*Danio rerio*) observando que houve uma elevada taxa de alterações histológicas nos testículos podendo ser associada à baixa taxa de eclosão em fêmeas que por sua vez apresentaram muitas alterações histológicas ovarianas. Outra observação relatada por Han *et al.* (2012) consistiu no aumento de vitelogenina, onde foi presente em todos os indivíduos machos tratados com 200 mg/L de endossulfan.

Estudos como este revelam o potencial risco dos agrotóxicos para os sistemas biológicos dos indivíduos, principalmente sistemas determinantes para o bom desenvolvimento e formação dos organismos.

Estes dados apontam que pequenas concentrações do agrotóxico são suficientes para que os gametas não consigam desempenhar atividades de deslocamento eficiente, impedindo assim a fertilização dos ovócitos. A ineficiência do deslocamento compromete totalmente as etapas fundamentais de reprodução, conseqüentemente interferindo na biologia da espécie tendo conseqüências para a manutenção dos estoques pesqueiros. Futuras pesquisas podem incluir abordagens relacionadas com a bioquímica do espermatozoide pós-congelamento a fim de esclarecer aspectos ultraestruturais relacionados com a sua viabilidade ao ser expostos a diferentes agrotóxicos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos da cipermetrina nos processos reprodutivos dos peixes teleósteos de água doce são notáveis, além de danos morfológicos e redução da qualidade dos gametas. Nos ensaios ecotoxicológicos com a exposição dos espermatozoides de *Colossoma macropomum* a esse piretróide sintético foi observada a redução da taxa de motilidade nas diferentes concentrações, indicando que o contaminante afeta negativamente o processo necessário para a fertilização.

Esta diminuição da taxa de motilidade espermática do sêmen de *Colossoma macropomum in natura* após a exposição ao inseticida expressa os prováveis efeitos adversos resultantes da exposição direta com as concentrações contendo os resíduos do agrotóxico, indicando a viabilidade de uso de células espermáticas em bioensaios ecotoxicológicos agudos.

A baixa taxa de motilidade dos espermatozoides nos testes com sêmen criopreservado após exposição às pequenas concentrações de cipermetrina indicou que o agrotóxico afeta diretamente os gametas e pode interferir posteriormente no processo de fertilização.

Apesar dos dados aqui obtidos serem promissores para programas de conservação dessa espécie de peixe nativa do Brasil, são necessários estudos mais detalhados para que se possa definir um protocolo de uso eficiente de

células espermáticas de tabaqui *in natura* e criopreservadas em ensaios ecotoxicológicos.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S., SINGH, A., TRIPATHI, P., MISHRA, M., SINGH, PK, SINGH, MP. Cypermethrin-induced nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration alters mitochondrial function: a proteomic study. **Molecular Neurobiology**. v.51, n. 2, p. 448e465, 2015.

ALAVI SM, COSSON J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**. v. 30, n. 1, p.1-14, 2006.

ALAVI, S. M. H., COSSON, J., BONDARENKO, O.; LINHART, O. Sperm motility in fishes:(III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme. **Theriogenology**, v.136, p. 143-165, 2019.

ANDEM, A. B.; IBOR, O.; JOSÉ, A.; EYO, V.; EDET. Toxicological evaluation and histopathological changes of synthetic pyrethroid pesticide (Cypermethrin) exposed to African Clariid mud Catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. **Journal of Toxicological and Pharmacological Research**, v. 8, n. 5, p. 360-367, 2016.

ANDRADE, E. S; ANDRADE, E.A.; FELIZARDO, V.O; PAULA, D.A. J.; VERAS, G. C.; MURGAS, L. D. S. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.39, n.1, p.195-201, 2015.

ARAÚJO, J. E. X. S. **Avaliação de indutores hormonais na reprodução de machos da espécie *Leiarius marmoratus* (GILL, 1870)**. 2012. 48 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2012.

BOMBARDELLI, R. A; NEUMANN, G; TOLEDO, C. P. R DE; SANCHES, E. A; BASTOS, D. DE N.; OLIVEIRA, J. D. S. **Motilidade espermática, fertilização e desenvolvimento larval de bagre prateado (*Rhamdia quelen*) em água contaminada com cobre** Semina: Ciências Agrárias, vol. 37, nº. 3, maio-junho, 2016, pp. 1667-1677 Universidade Estadual de Londrina.

BOBBE, J.; LABBÉ, C. Chilled storage of sperm and eggs. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M. P. (Eds). **Methods in reproductive Aquaculture: Marine and freshwater species**. 1ª ed. FL, USA: Taylor e Francis Group, LLC, p.219-236, 2008.

BUDHWAR, S., SINGH, V., VERMA, P., SINGH, K. Fertilization failure and gamete health:Is there a link? **Frontiers in Bioscience**. (Scholar edition). v. 9, p. 395–419, 2017.

CAROLSFELD, J.; GODINHO H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J.

Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. Sociedade de Pesca das Ilhas Britânicas, **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472–489, 2003.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; PINHEIRO SOUSA, D. B.; MACÊDO-SOBRINHO, I. C.; HORTON, E. Y.; ALMEIDA, Z. S.; TCHAICKA, L.; SOUSA, A. L. Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalmidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(20), 15994–16003, 2015.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. de A.; SILVA, C. M. G. Da; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R. De.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

CASTRO, J. S.; FRANÇA, C. L.; CARDOSO, R. L.; SILVA, W. M. M. L.; SANTANA, T. C. S.; SANTOS, D. M. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; TEIXIERA, E. G. T. Histological Changes in the Kidney of *Sciades Herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) for Environmental Monitoring of a Neotropical Estuarine Area (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 103, p. 246–254, 2019.

CASTRO, J. S.; BRAZ-MOTA, S., CAMPOS, D. F., SOUZA, S. S., & VAL, A. L. High temperature, pH, and hypoxia cause oxidative stress and impair the spermatoc performance of the amazon fish *Colossoma macropomum*. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 772, 2020.

CUNHA, F. D. S., SOUSA, N. D. C., SANTOS, R. F. B., MENESES, J. O., DO COUTO, M. V. S., DE ALMEIDA, F. T. C., SENA-FILHO, J.G.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A.N.; FUJIMOTO, R. Y. Deltamethrin-induced nuclear erythrocyte alteration and damage to the gills and liver of *Colossoma macropomum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 15102-15110, 2018.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSSON, J., DREANNO, C., BILLARD, R., SUQUET, M. & CIBERT, C. Regulação dos parâmetros das ondas axonemais de espermatozoides de peixes por fatores iônicos. No Gameta Masculino: do Conhecimento Básico às Aplicações Clínicas (Gagnon, C., ed.), pp. Montreal: **Cache River Press**, 1999.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, **Oxford**, v. 76, n. 1, p. 240-279, 2010.

DADRAS, H., DZYUBA, V., COSSON, J., GOLPOUR, A., & DZYUBA, B. The in vitro effect of temperature on motility and antioxidant response of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. **Journal of Thermal Biology**, 59, 64–68, 2016.

DAWAR, F.U.; ZUBERI, A.; AZIZULLAH, A.; KHAN KHATTAK, M.N. Effects of cypermethrin on survival, morphological and biochemical aspects of rohu (*Labeo rohita*) during early development. **Chemosphere**, 144, 697–705, 2016.

DIAS-FILHO, V. A.; SANTANA, D. S.; CAVALCANTE, S. S.; NASCIMENTO, A. L. C.; FUJIMOTO, R. Y.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C.; MARIA, A. N. Protocolo para congelamento e descongelamento do sêmen de tambaqui em macropalhetas. **V Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2015.

ENI, G.; IBOR, O.R.; ANDEM, A.B.; OKU, E.E.; CHUKWUKA, A.V.; ADEOGUN, A.O.; ARUKWE, A. Biochemical and endocrine-disrupting effects in *Clarias gariepinus* exposed to the synthetic pyrethroids, cypermethrin and deltamethrin. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 225, 108584, 2019.

FABBROCINI, A.; D'ADAMO, R.; DEL PRETE, F., LANGELLOTTI, A. L., RINNA, F., SILVESTRI, F.; SORRENTI, G.; VITIELLO, G.; SANSONE, G. Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 293-298, 2012.

FARAG, M. R., ALAGAWANY, M., BILAL, R. M., GEWIDA, A. G., DHAMA, K., ABDEL- LATIF, H. M., AMER, M. S., RIVERO-PEREZ, N., ZARAGOZA-BASTIDA, A., BINNASER, Y. S., EL-SABER BATIHA, G., NAIEL, M. A. An Overview on the Potential Hazards of Pyrethroid Insecticides in Fish, with Special Emphasis on Cypermethrin Toxicity. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1880, 2021.

FAUSTINO, F. **Parâmetros seminais, ultraestruturais, criopreservação e androgênese de espécies do gênero *Brycon* ameaçadas de extinção**. 2014.128p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

GALLEGO, V., CAVALCANTE, S. S., FUJIMOTO, R. Y., & CARNEIRO, P. C. F. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Collossoma macropomum*). **Theriogenology**, 87, 16–24, 2017.

GALLEGO, V., HERRANZ-JUSDADO, J.G., ROZENFELD, C. et al.

Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. **Fish Physiology Biochemistry** 44, 1457–1467, 2018.

GALLO; A.; BONI, R.; TOSTI, E. Gamete quality in a multistressor environment. **Environment International**. v. 138, p. 105627, 2020.

GARCIA, RAYCON ROBERTO FREITAS. **Qualidade seminal de reprodutores *Brycon insignis* e *Colossoma macropomum***/ Raycon Roberto Freitas Garcia. 2017. 84f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

GAZO, I.; LINHARTOVA, P.; SHALIUTINA, A.; HULAK, M. Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on quality, DNA integrity, and antioxidant responses of sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, 377-385, 2013.

GEORGIEVA, E.; YANCHEVA, V.; STOYANOVA, S.; VELCHEVA, I.; ILIEV, I.; VASILEVA, T.; BIVOLARSKI, V.; PETKOVA, E.; LÁSZLÓ, B.; NYESTE, K. Which is more toxic? Evaluation of the short-term toxic effects of chlorpyrifos and cypermethrin on selected biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). **Toxics**, v. 9, n. 6, p. 125, 2021.

GUPTA, P.K. *Illustrated Toxicology: With Study questions*, **Academy press**, 2018.

HAN, Z.; JIAO, S., KONG, D., SHAN, Z.; ZHANG, X. Effects of β -endosulfan on the growth and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 2525-2531, 2011.

Idris, S.B, Ambali, S.F, Ayo, J.O. Citotoxicidade de clopirifós e cipermetrina: os efeitos melhoradores dos antioxidantes. **African. Journal of Biotechnology**. v.11, n. 99, p. 16461e16467, 2012.

JINDAL, R.; SHARMA, R. Neurotoxic responses in brain of *Catla catla* exposed to cypermethrin: A semiquantitative multibiomarker evaluation. **Ecological Indicators**, 106, 105485, 2019.

KARATAS, T.; YILDIRIM, S.; ARSLAN, H.; AGGUL, A. G. The effects on brown trout (*Salmo trutta fario*) of different concentrations of deltamethrin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 226, p. 108606, 2019.

KAVIRAJ, A.; GUPTA, A. Biomarkers of type II synthetic pyrethroid pesticides in freshwater fish. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

KOPEIKA; KOPEIKA J. Variabilidade da qualidade do esperma após criopreservação em peixes. Pt: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G,

editores. Espermatologia de Peixes. Oxford Reino Unido: **Alpha Science Inc.**, p. 347-396, 2007.

KHAFAGA, A.F.; NAIEL, M.A.E.; DAWOOD, M.A.O.; ABDEL-LATIF, H.M.R. Dietary *Origanum vulgare* essential oil attenuates cypermethrin-induced biochemical changes, oxidative stress, histopathological alterations, apoptosis, and reduces DNA damage in Common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, 228, 105624, 2020.

KUTLUYER, F.; BENZER, F.; ERIŞİR, M.; ÖĞRETMEN, F.; İNANAN, B. E. The *in vitro* effect of cypermethrin on quality and oxidative stress indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 63-67, 2016.

LEITE, L. V.; DE OLIVEIRA, F. D. C. E.; NUNES, L. T.; NUNES, J. F.; SALMITO- VANDERLEY, C. S. B. Criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com água de coco em pó ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, n. 2, p. 23-29, 2011.

LENZ, D. R. **Caracterização e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores**. 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

LENZ, D. R. VICTORIO, A.M.; LIMA, M.C.C.; PRADO, T.F.; DE PAULA, F.G.; MEIRINHOS, M.L.G.; ARNHOLD, E. Caracterização do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a época reprodutiva. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, pág. 603-607, 2018.

LINHART O, COSSON J, MIMS SD, SHELTON WL, RODINA M. Efeitos dos íons na motilidade de espermatozoides frescos e desmembrados de paddlefish (*Polyodon spathula*). **Reprodução**. v.124, p. 713-719, 2002.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, no. 4, p. 469-484, 2010.

LOBO, F. P.; CINTRA, L. C.; VARELA, E. S.; ALVES, A. L.; VILLELA, L. C. V.; SILVA, N. M. A.; PAIVA, S. R.; CAETANO, A. R. Genome assembly of the South American freshwater fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **PLANT & ANIMAL GENOME CONFERENCE**, 23., 2015.

LOSSO, C.; NOVELLI, A. A., PICONE, M., MARCHETTO, D., PANTANI, C., GHETTI, P. F.; GHIRARDINI, A. V. Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 2, p. 252-257, 2007.

MCLAREN, J. F. Avaliação de infertilidade. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. 39, 453– 463, 2012.

MADEIRA, E. M. et al. Evaluation of different intra and extracellular cryoprotectants on bull semen cryopreservation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 415-420, 2013.

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., (Ed.), Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa, Amapá**, pp. 47-63, 2009.

MARIA, A. N., AZEVEDO, H. C., SANTOS, J. P., CARNEIRO, P. C. F., Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, 20(1), 39-43. 2010.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comunicado Técnico EMBRAPA**, nº112, 2011,8p.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C; FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, P. C. F.; PARDO, J. Q. Protocolo para avaliação morfológica de espermatozoides de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comunicado Técnico EMBRAPA**, nº 207, 2017,5p.

MARTÍNEZ, J. G.; PARDO CARRASCO, S. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EN PECES: EFECTOS SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y LA FERTILIDAD. **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, n. 2, p. 3-24, 2010.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; BARBOSA, V.; PÉREZ-CEREZALES, S.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M. P. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 128-133, 2009.

MENDES, C. E. P.; SANTOS, F. S. E.; LUZ, K. S. R.; SANTANA, L. P. **Agrotóxicos**: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira-uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, n. 17, p. 95-107, 2019.

MEDINA-ROBLES, V. M.; SUÁREZ-MARTÍNEZ, R.O.; BALDISSEROTTO, B.; CRUZ-CASALLAS, P.E. **Sêmen criopreservado de *Piaractus orinoquensis* (Serrasalminidae)**: Tempos de armazenamento pós-descongelamento e soluções ativadoras. **Acta Biológica Colombiana**., v. 28, n.1, 2023.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 177-187, 2011.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos Toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes - Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX – n. 18, 2012.

MORAIS, I. D. S.; O'SULLIVAN, F. D. A. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 81-93, 2017.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J.A. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

OLIVEIRA, A.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R.; IZAÚ Z. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

PEREIRA, A. S.; TEIXEIRA, E. G.; ANDRADE, T. P., CASTRO, J. D. J. P.; ALVES, S. R. P.; CARVALHO- NETA, R. N. F. C. Preservação a curto prazo de espermatozoides de *Bryconamazonicus* de uma área protegida do Brasil. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 11, p. e2589119575-e2589119575, 2020.

PINHEIRO, J.P.S., LEITE-CASTRO, L.V., OLIVEIRA, F.C.E., LINHARES, F.R.A., LOPES, J.T. & SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**. v.17 n.2, p. 267-273, 2016.

PINHEIRO, J. P. S.; DE ASSIS, C. B., SANCHES, E. A.; MOREIRA, R. G. Aluminum, at an environmental concentration, associated with acidic pH and high water temperature, causes impairment of sperm quality in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). **Environmental Pollution**, v. 262, p. 114252, 2020.

PINTO, A. C; MARQUES, L.H.B.S; SANTOS, F.L.B Uso de bioensaio na avaliação ecotoxicológica de lagos urbanos (Paulo Afonso/BA) com *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) Chordata: Teleostei). **Revista Brasileira de Pesquisa Animal e Ambiental**, v. 3, n. 3, p. 1297-1313, 2020.

PRUSTY, A. K.; MEENA, D. K., MOHAPATRA, S., PANIKKAR, P., Das, P., GUPTA, S. K.; BEHERA, B. K. Synthetic pyrethroids (Type II) and freshwater fish culture: Perils and mitigations. **International aquatic research**, v. 7, p. 163-191, 2015.

RODRIGUES, J. B.; ZIMMERMANN, G. P. R.; DA ROSA NETO, E.; GEHLEN, G.; SILVA, L. B. Analysis of histopathological abnormalities in the gills of *Astyanax jacuhiensis* (Characidae) for assessment of water quality in the Ijuí River, southern Brazil. **Acta toxicológica argentina**, v. 26, n. 3, p. 99-103, 2018.

SALAKO, A. F.; AMAEZE, N. H.; SHOBAJO, H. M.; OSUALA, F. I. Comparative acute toxicity of three pyrethroids (Deltamethrin, cypermethrin and lambda-cyhalothrin) on guppy fish (*Poecilia reticulata* peters, 1859). **Scientific African**. v. 9, p. e00504, 2020.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; VIEIRA, M.J.A.F.; LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E.; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v.22, p.255-268, 2012.

SALMITO-VANDERLEY, C., S., B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P., S.; NASCIMENTO, R., V. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelação e uso de antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.194-199, out./dez. 2016.

SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D.M.; TESSARO, S.; BALEN, R. E.; BOMBARDELLI, R.A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1163-1167, 2011.

SANTOS, J. P. **Cinética espermática e fertilização de ovócitos de Tambaqui *Colossoma macropomum* com sêmen *in natura* e criopreservado**. 2013. 74 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

SANTOS, J. P.; ALMEIDA, S. J. M.; COSTA, C. C.; GUIMARÃES, E. C.; TEIXEIRA, E. G.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Reproductive aspects of freshwater fishes exposed to pesticide-contaminated environments: A systematic review. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 8, n. 19, p. 1155-1168, 2021.

SANTOS, J. P.; ALMEIDA, S. J. M.; COSTA, C. C.; FERREIRA, A. N. S.; TEIXEIRA, E.G.; GUIMARÃES, E. C.; BRITO, P. S.; OTTONI, F. P.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Changes in sperm motility of amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816) (Characiformes: serrasalmidae) exposed to two pesticides. **Biota Neotropica** v. 23, p. e20221471, 2023.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S. J.; ESKER, P.; MCROBERTS, N.; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on

major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019.

SCOTT, A.P, BAYNES, S. M. Uma revisão da biologia, manuseio e armazenamento de espermatozoides de Salmonídeos. **Journal of Fish Biology**, v.17, n. 39, p.707, 1980.

SERHAT, E.; ÖZGÜR, A. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos using different cryoprotectant. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 8, n.2, p. 1-10, 2022.

Shi, X., Gu, A., Ji, G., Li, Y., Di, J., Jin, J., Song, L., 2011. Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 1010-1016, 2011.

SILVA, J. S. et al. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 92, p. 409-418, 2015.

SILVA, E. G. O. **Manejo da reprodução do pirarucu (*Arapaima gigas*) na piscicultura boa esperança, no estado de Rondônia, Brasil**. 2016. 64 f. Dissertação (mestrado em Produção Animal) – Universidade Brasil, Descalvado, 2016.

SOLTANIAN, S.; FERREIDOUNI, M. S. Immunotoxic responses of chronic exposure to cypermethrin in common carp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.43, 1645–1655, 2017.

SOUSA, R. G. C.; SALLES, D. N. De. S. Avaliação de diferentes taxas de povoamento sobre o ganho de peso de juvenis de tambaqui. **Biota Amazônia** ISSN 2179-5746. Macapá, v. 5, n. 4, p. 97-101, 2015. Disponível em: Disponível em <http://periodicos.unifap.br/index.php/biota> Submetido em 25 de Maio de 2015 / Aceito em 22 de Outubro de 2015.

STREIT JR, D.P.; GODOY, L.C.; RIBEIRO, R.P.; FORNARI, D. C.; DIGMAYER, M. ZHANG, T. Cryopreservation of embryos and oocytes of South American fish species. **InTech**, 2014.

Ullah, R., Zuberi, A., Naeem, M., Ullah, S., 2015. Toxicity to hematology and morphology of liver brain and gills during acute exposure of Mahseer (*Tor putitora*) to cypermethrin. **International journal of agriculture and biology**, v. 17, n. 1, 2015.

Ullah, S.; Zuberi, A.; Alagawany, M.; Farag, M. R; Dadar, M.; Karthik, K; Tiwari, R.; Dhama, K.; Iqba, H. M.. Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 863-871, 2018.

VANZETTO, G. V. **Efeitos letais e subletais de cipermetrina e deltametrina em larvas de *physalaemus gracilis* (anura: leptodactylidae)**. 2016. 45f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016.

VARELA-JUNIOR, A. S. **Criopreservação seminal de tambaqui, *Colossoma macropomum***. 2011. 108f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

VARELA-JUNIOR, 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 (Rio Grande)**, v. 34, n. 2, p. 129-137, 2012.

VASCONCELOS, A. C. N.; DE OLIVEIRA, F. V.; DE CARVALHO, A. F. S.; GARCIA, R. R. F.; RAMOS, S. E.; MURGAS, L. D. S. Criopreservação do sêmen do *Prochilodus lineatus*:efeito da combinação de crioprotetores. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. especial, p. 817-824, 2015.

VIEIRA, E. F.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818, (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 29, n. 4, p. 625-638, 1999.

XIANG, D.; ZHONG, L.; SHEN, S.; SONG, Z.; ZHU, G.; WANG, M.; WANG, Q.; ZHOU B. Chronic exposure to environmental levels of cis-bifenthrin: Enantioselectivity and reproductive effects on zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 251, p. 175-184, 2019.

XU, C.; LI, X.; JIN, M.; SOL, X.; NIU, L.; LIN, C.; LIU, W. Early exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to synthetic pyrethroids and their metabolites: a comparison of phenotypic and behavioral indicators and gene expression involved in the HPT axis and the innate immune system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 12992-13003, 2018.

WANG, Y. L. LV, Y. YU, G. YANG, Z. XU, Q. WANG, L. C. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.170, p. 61-67, 2017.

ZHU, X.; XIONG, Z.; ZHOU, S.; XIE, S.; LI, H.; LI, Q.; YANG, G. Análise dos danos reprodutivos em minhocas (*Amyntas corticis*) expostas à cipermetrina, *Ecotoxicologia e Segurança Ambiental*. **Elsivier**. (2022).