



CONSERVAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES

Luana Barbosa¹, Thiago Gonsalo da Silva², Félix António oliveira de Souza³, Phyllipe Thiago Leite Barbosa¹, Michel Franklin Moura Prates⁴, Thiago Martins Xavier⁴, Ruy Alberto Caetano⁵, Jayme Aparecido Povh⁵

¹Doutorando(a) em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: luana.bio@hotmail.com, ptlb2006@gmail.com;

²Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: thiagogonsalo@gmail.com

³Graduando em Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: Felix02oliveira@gmail.com

⁴Mestrando em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: thiago.aquims@gmail.com, michel.zotec@hotmail.com

⁵Professor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: jayme.peixegen@gmail.com, ruy.filho@ufms.br.

Resumo: A utilização de técnicas de conservação seminal vem assumindo um papel relevante na aquicultura, pois estas técnicas possibilitam manter a qualidade seminal por um maior período de tempo quando comparado com o sêmen *in natura*, além de solucionar problemas com a falta de sincronia entre os reprodutores, transporte de gametas, troca de material genético entre pisciculturas e em programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção. Apesar de muitas técnicas serem conhecidas, o resfriamento e a criopreservação são as mais utilizadas. A criopreservação consiste em utilizar crioprotetores intra e extracelulares e manter o sêmen em nitrogênio líquido (-196°C) o que permite conservar o sêmen por tempo indeterminado. Sendo assim, objetivou-se descrever as técnicas utilizadas na conservação de sêmen de peixe.

Palavras-chave: Aquicultura; Conservação genética; Crioprotetor celular; Transporte de gametas

CONSERVATION AND CRIOPRESERVATION OF FISH SEMEN

Abstract: The use of seminal conservation techniques has been playing an important role in aquaculture since these techniques make it possible to maintain the seminal quality for a longer period of time when compared to the semen *in natura*, as well as to solve problems with the lack of synchrony between the reproducers, transport of gamete, exchange of genetic material between fish farms and in programs of preservation of species threatened with extinction. Although many techniques are known, cooling and cryopreservation are the most commonly used. Cryopreservation consists of using intra- and extracellular cryoprotectants and maintaining the semen in liquid nitrogen (-196°C), which allows the preservation of the semen indefinitely. Thus, it was aimed to describe the techniques used in the conservation of fish semen.

Keywords: Aquaculture; Genetic conservation; Cell cryoprotectant; Transport of gametes.

INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de conservação seminal, o resfriamento e a criopreservação se destacam por ajudar a solucionar problemas com a falta de sincronia entre os reprodutores, transporte de gametas, troca de material genético entre pisciculturas e em programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção (GODINHO, 2007; VIEIRA et al., 2011). Desta forma, é essencial o aprimoramento de técnicas aplicadas à reprodução a qual vem assumindo papel relevante na aquicultura (MURGAS et al., 2004).

A técnica de resfriamento seminal em curto prazo utilizando gelo para a conservação dos sêmen de peixes é uma prática bastante antiga (BARRET, 1951; BILLARD & LEGENDRE, 1982;



KAVAMOTO et al., 1987). Esta técnica consiste na utilização de caixas térmicas com gelo o que possibilita que o sêmen seja armazenado permanecendo viável por horas ou dias (BILLARD et al., 2004), sendo um método menos estressante do que manter os peixes em tanques de contenção garantindo que o sêmen permaneça viável até o momento desejado (DILAURO et al., 1994).

A criopreservação seminal em peixes foi obtida com sucesso a mais de 50 anos (BLAXTER, 1953), sendo atualmente aplicada para praticamente todas as espécies de peixes. Esta técnica consiste na retirada de água do interior da célula espermática a fim de evitar a formação de cristais de gelo intracelular, além disso, permite que o sêmen seja armazenado por tempo indeterminado o que possibilita a redução de custos com animais e a preservação da variabilidade genética para usos futuros (CARNEIRO, 2007). O procedimento para criopreservação consiste na diluição do sêmen em um diluidor, crioprotetor intracelular e crioprotetor extracelular sem que ocorra a ativação das células espermáticas e possibilitar o armazenamento (MARIA & CARNEIRO, 2012).

Apesar da variação entre as características seminais entre espécies, o desenvolvimento das técnicas de congelamento do sêmen de peixes tem sido feito frequentemente com base em testes apresentando resultados heterogêneos para todas as espécies (VIVEIROS & GODINHO, 2009). Desta forma objetivou-se descrever as técnicas utilizadas para a conservação do sêmen de peixe.

DESENVOLVIMENTO

Seleção de reprodutores

Os animais são considerados aptos para reprodução quando liberam uma pequena gota de sêmen sob uma leve pressão abdominal conforme recomendação de Streit Jr et al (2005). Após isso, os animais são induzidos hormonalmente com 2,5 mg de extrato bruto de pituitária de carpa (CPE) por kg de peso vivo em uma aplicação única, conforme posologia recomendada por Woynarovich and Horváth (1983).

Coleta de Sêmen

A coleta do sêmen para conservação (resfriamento ou congelamento) depende de certos cuidados no momento da coleta a fim de que não ocorra a ativação do espermatozoide antes do momento em que se deseja fazer a utilização. Para isso é necessário que a papila urogenital esteja seca a fim de evitar qualquer tipo de contaminação com água, urina ou sangue (POUPARD et al., 1998), pois os espermatozoides são imóveis e estão inativos dentro dos testículos e o contato com a água, urina ou sangue no momento da coleta faz com que o mesmo seja ativado, e esta ativação é irreversível, apresentando baixo tempo de motilidade (alguns segundos ou minutos), perdendo a capacidade de fecundação (CARNEIRO, 2007).

Avaliação seminal

A aplicação da técnica de criopreservação depende da seleção de reprodutores com sêmen de boa qualidade. Para isso após a coleta deve-se realizar a avaliação espermática a qual irá caracterizar qualitativamente e quantitativamente os sêmen dos diferentes reprodutores, o que possibilita a seleção de sêmen de melhor qualidade para ser submetido ao processo de criopreservação (CABRITA et al., 2010). A motilidade espermática é a avaliação mais utilizada para determinar a qualidade espermática, pois os espermatozoides devem apresentar capacidade de ativação em contato com a água para que possam atingir os ovócitos no momento da fertilização, além do tempo de duração de motilidade que pode variar de acordo com a espécie avaliada indo de 1 hora, como observado em *Poeciliareticulata*, ou de 20 a 25 segundos, como observado em trutas (COSSON et al., 1999).

Resfriamento

A técnica de resfriamento seminal é bastante vantajosa por apresentar um baixo custo e permitir que as sêmen sejam armazenadas em caixas com gelo estando apto à fertilização dos ovócitos por um maior intervalo de tempo em relação aos sêmen *in natura*, possibilitando um aumento significativo no tempo de motilidade quando comparado ao sêmen mantido em temperatura ambiente, garantindo assim maior produtividade no processo de reprodução (MARQUES & GODINHO 2004) e facilidade no transporte (HENDERSON & DEWAR, 1959; DAVY & CHOUINARD, 1980; CARNEIRO et al., 2006).



O resfriamento do sêmen pode conservar as características seminais por horas ou até dias, permitindo a utilização do sêmen no momento mais adequado da reprodução (STOSS, 1983; CÓSER, 1988; MCNIVEN et al., 1993; VIVEIROS et al., 2014) uma vez que tem menor custo em relação as técnicas de congelamento (HE & WOODS, 2003) e não necessitada adição de soluções crioprotetoras, possibilitando o resfriamento em temperaturas de 1-15°C (MARQUES, 2001).

Existem vários trabalhos que mostram a eficiência da utilização desta técnica onde apresentou bons resultados de motilidade espermática quando o sêmen foi resfriado em temperaturas de 1,7-4,9°C (MARQUES & GODINHO, 2004), 5,7°C (CARNEIRO et al., 2006), 4°C (MURGAS et al., 2002; MURGAS et al., 2004), 4-6°C (OLIVEIRA et al., 2007;). O sêmen de *L. friderici*; *L. elongatus* e *P. mesopotamicus*; *P. lineatus* foram mantidos a uma temperatura de 1,7-4,9°C e mantiveram motilidade de 30% (após 8 horas) e 40% (após 20 horas) respectivamente (MARQUES & GODINHO, 2004), e *L. marmoratus* teve seu sêmen armazenado a 13,0 ± 2,0°C e após 7 horas apresentou 40% de motilidade (GALO et al., 2014).

Criopreservação

A criopreservação tem sido bastante utilizada para conservação do sêmen de diferentes espécies de peixes (FELIZARDO et al., 2010; ORFÃO et al., 2011), permitindo o armazenamento dos gametas em nitrogênio líquido a -196°C (Figura 3) por tempo indeterminado permitindo assim a manutenção da viabilidade celular possibilitando e seu uso futuramente (CARNEIRO, 2007; FELIZARDO, 2010).

Esta técnica pode ser dividida em três etapas: 1- exposição das células à solução crioprotetora; 2- regulação osmótica das células com o meio extracelular; 3- redução da temperatura, passando pelo ponto de congelamento da água e da solução crioprotetora (LEZCANO, 2001).

O sucesso da criopreservação depende das soluções diluidoras, utensílios utilizados, das concentrações dos crioprotetores intracelular e extracelular, curva de congelamento, tempo de equilíbrio, taxas de diluição, pois se trata de uma técnica baseada na retirada do excesso de água do interior das células espermáticas e a exposição das células a condições extremas o que não são fisiologicamente adequadas, sendo que alguns fatores afetam a motilidade, morfologia, composição do plasma e evitando a formação de cristais de gelo intracelulares, impedindo que cause danos aos espermatozoides, permitindo assim seu armazenamento adequado (BUTSS et al., 2011; MELO-MACIEL et al., 2012; MARIA & CARNEIRO, 2012; MARTINEZ-PÁRAMO et al., 2012; SALMITO-VANDERLEY et al., 2014).

Para a aplicação da criopreservação, é fundamental escolher o diluente apropriado, (solução salina ou a base de glicose), levando em consideração a osmolaridade ideal (características próximas ao plasma seminal) e preservar a capacidade de fertilização por meio do controle de pH, osmolaridade, concentração de íons e, em alguns casos, atuando como fonte de energia (YANG & TIERSCH, 2009; VIVEIROS et al., 2012).

Muitos trabalhos já foram realizados testando soluções crioprotetoras e a qualidade espermática após o descongelamento, entre elas estão: Vieira (2010) testando DMSO + ACP - 104® no sêmen de tambaqui (*Colossomamacropomum*) obteve uma motilidade de 55% após o descongelamento. Le et al. (2011) avaliaram o uso de DMSO, etilenoglicol, metanol e glicerol, ambos nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, como crioprotetores intracelulares na criopreservação de sêmen de corvina (*Larimichthyspolyactis*) e observaram que o etilenoglicol na concentração de 10% apresentou melhor resultado de motilidade espermática com média de 73,7%. Ao se utilizar DMSO + BTS em pirapitinga (*Piaractusbrachyomus*) foi obtida uma motilidade de 51% e quando feita a utilização de metilglicol + glicose testando a mesma espécie obteve-se 81% (NASCIMENTO et al., 2010). Em teste com DMSO + glicose + gema de ovo em piabanha (*Piaractus insignis*), obteve-se motilidade de 86% após o descongelamento (SHIMODA et al., 2004).

Ao se avaliar o uso de amidas em comparação ao DMSO (10%) e glicerol (5%) como crioprotetores intracelulares para sêmen de tambaqui, foi observado melhores resultados de taxas de fertilização, eclosão e integridade dos espermatozoides nas amostras criopreservadas com o uso de



amidas, incluindo a DMF, onde a taxa de fertilização média foi de 91,6%, superior à observada no presente trabalho (VARELA JR. et al., 2012).

Tão importante quanto a execução da criopreservação de forma correta é a utilização das soluções crioprotetoras intra e extracelular em conjunto com um meio diluidor para que o resultado final seja um sêmen de ótima qualidade pois cada um desses desenvolvem um papel muito importante nas técnicas de criopreservação.

Soluções crioprotetoras

O sucesso da criopreservação depende da correta aplicação dos procedimentos de congelamento/descongelamento os quais provocam danos celulares devido à formação de cristais de gelo intracelular implicando diretamente nas alterações da membrana plasmática do espermatozoide e lesões no DNA (SOARES & GUERRA, 2009; MARTINEZ & CARRASCO, 2010).

A técnica de criopreservação seminal depende da adição de uma solução crioprotetora intra ou extracelular os quais tem a capacidade de penetrar na membrana celular evitando qualquer tipo de dano que possa ser causado no congelamento do sêmen, como por exemplo, a formação de cristais de gelo intracelular ou a desidratação excessiva (SURQUET et al., 2000; VARELA JR. et al., 2009; YANG & TIERSCH, 2009), podendo ser associadas para se obter um melhor desempenho (DENNISTON et al., 2000).

A criopreservação em peixes deve ocorrer com um cuidado especial em relação à osmolaridade do diluente, para que não ocorra a ativação das células espermáticas (CHAMBEYRON & ZOHAR, 1990) e desenvolver alternativas de soluções crioprotetoras, que protejam o material genético, minimizando as perdas na qualidade seminal após o descongelamento (HOLT, 2000).

Diluidor

O diluidor é utilizado a fim de manter a viabilidade da célula espermática e evitar que ocorra crioinjúrias durante o processo de congelamento e descongelamento seminal (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012) permitindo o aumento do volume total do ejaculado, facilitando a divisão das doses inseminantes e proporciona um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides in vitro (DERIVAUX, 1980). O diluidor deve apresentar as seguintes características: nutrientes como fonte de energia; proteger os espermatozoides (células espermáticas) dos efeitos do frio durante a congelamento; proporcionar um meio tampão; manter a pressão osmótica adequada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Alguns diluentes já foram testados em peixes os quais apresentaram sucesso como a água de coco in natura (FARIAS et al., 1999), Beltsville Thawing Solution® (MURGAS et al., 2007), água de coco em pó (LEITE et al., 2011), glicose (LOPES et al., 2014), entre outros.

Dentre os diluidores mais utilizados para criopreservação em sêmen de peixes, é a solução de glicose numa concentração de 5%, pois esta age como substrato de energia, componente osmótico e agente crioprotetor em função do seu alto peso molecular, possibilitando o equilíbrio osmótico e atuando como substituto de eletrólitos (HOLT, 2000).

Crioprotetorextracelular

O crioprotetor extracelular é uma substância adicionada ao sêmen capaz de revestir a célula e proteger a membrana celular dos possíveis danos que possam ocorrer no momento do congelamento além de funcionarem como fonte de nutrientes e auxiliar na conservação dos espermatozoides (CAROLSFELD et al., 2003; CARNEIRO, 2007). Para isso é necessário primeiramente escolher um diluente apropriado com osmolaridade ideal que apresentem características próximas ao plasma seminal, podendo ser solução salina ou a base de glicose (YANG & TIERSCH, 2009; VIVEIROS et al., 2012).

A gema de ovo e o leite em pó são comumente utilizados para serem adicionadas ao meio diluidor como componentes básicos (VIVEIROS & GODINHO, 2009). A gema utilizada com maior frequência por atuar como fonte de nutrientes e apresentar uma ação crioprotetora que está



relacionada à presença de lecitina e lipoproteínas que protegem os espermatozoides do choque térmico durante o processo de criopreservação (MIES FILHO et al., 1982), que além de proteger as células espermáticas durante o armazenamento ainda auxilia na avaliação da motilidade no momento do descongelamento (VIVEIROS et al., 2011; SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

Crioprotetorintracelular

O crioprotetor intracelular é uma substância capaz de penetrar e retirar a água da célula diminuindo a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo assim que se formem cristais de gelo intracelulares durante o congelamento (CARNEIRO, 2007). Dentre eles estão o DMSO (dimetilsulfóxido), glicerol, metanol e metilglicol que podem ser utilizados para a criopreservação em concentrações abaixo de 20% de forma que não seja tóxico (SUQUET et al., 2000; VIVEIROS & GODINHO, 2009; CUERVAS-URIBE et al., 174 2011).

O DMSO é o mais utilizado para criopreservação de sêmen de espécies de água doce em concentrações de 5 a 15% (VIVEIROS & GODINHO, 2009). O qual também apresentou bons resultados para salmonídeos, como truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (YOUNG et al., 2009) e esturjões (HORVÁTH et al., 2008). Por outro lado, altas concentrações desses crioprotetores ao invés de promover uma maior proteção a célula espermática podem tornar-se tóxicas e/ou letais. Desta forma, torna-se indispensável à utilização de uma posologia ideal para que este proteja os espermatozoides das crioinjúrias sem prejudicá-los (YANG & TIERSCH, 2009).

Envase

Vários são os tipos de recipientes que estão sendo avaliados em relação a sua capacidade de armazenamento, dimensões e material a fim de manter a qualidade espermática, os quais podem influenciar nas taxas de transferência de calor modificando a velocidade de congelamento e descongelamento espermático (CABRITA et al., 2001).

O material utilizado para armazenamento do sêmen para criopreservação deve assegurar a identificação e a uniformidade da velocidade do congelamento (YANG & TIERSCH, 2009). Dentre eles estão as palhetas francesas de 0,25 e 0,5 mL, macropalhetas, criotubos, sacos e tubos plásticos de volume variável, geralmente entre 1,0 e 5,0 mL (MARIA & CARNEIRO, 2012).

Para o congelamento do sêmen de peixe as palhetas francesas de 0,5 mL são as mais utilizadas por possibilitar a perda de calor uniforme devido a pequena superfície de contato, porém apresentam uma pequena capacidade de armazenamento do sêmen criopreservado sendo preciso um grande número de palhetas para fertilizar um grande número de ovócitos em cada desova, principalmente quando se trata de espécies reofílicas (VELASCO-SANTAMARIA et al., 2006; VIVEIROS & GODINHO, 2009).

Quando se trata de um grande volume seminal ou uma produção em larga escala no setor produtivo o uso de criotubos pode facilitar o armazenamento no processo de criopreservação o que facilita a manipulação no processo de descongelamento e fertilização (DING et al., 2011; MARIA & CARNEIRO, 2012; DIAS FILHO et al., 2015; MARIA et al., 2015). Os diversos tipos de recipientes utilizados para o envase do sêmen para criopreservação com taxas de congelamento e descongelamento lentos, podem influenciar diretamente na taxa de fertilização e eclosão por ocasionarem danos que afetam diretamente a qualidade espermática (CABRITA et al., 2001).

Após o envase, o recipiente com sêmen é transferido para dryshipper -153°C por 30 minutos, este equipamento atua liberando vapor de nitrogênio fazendo com que ocorra a congelação das células de forma gradativa e, só depois desse período é que são transferidas para os botijões de nitrogênio líquido -196°C (VIVEIROS & GODINHO, 2009; PINHEIRO et al., 2016).

Descongelamento

O descongelamento é um processo tão importante quanto o congelamento, por isso necessita que seu procedimento também seja realizado de maneira correta. A velocidade do descongelamento deve ser controlada tanto quanto no congelamento, pois não deve permitir a formação de cristais intracelulares o



que pode ocasionar danos nas células (CARNEIRO, 2007).

O processo de descongelamento em espécies tropicais, normalmente, é realizado com a imersão do recipiente com sêmen em água a temperatura de 45 a 60°C por um período de três a oito segundos (CARNEIRO, 2007).

Embora a criopreservação tenha trazido muitos benefícios quanto a sua utilização para a produção de pescado, estudos ainda buscam diminuir e/ou eliminar os fatores que ocasionam a redução da viabilidade e a fertilidade espermática após descongelamento (STREIT JR. et al, 2009).

A velocidade do processo de descongelamento influencia diretamente na qualidade seminal, pois quando este procedimento é realizado de forma lenta faz com que a célula fique intumescida e tenha suas propriedades morfológicas e fisiológicas alteradas e quando esse processo é realizado de forma rápida diminui a recristalização da água e o inchaço celular diminuindo assim os danos na membrana plasmática (MAZUR, 1984). Sendo assim, o processo de congelamento é muito importante na utilização da técnica de criopreservação de sêmen em peixes, pois influencia na velocidade do descongelamento (RODINA et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o resfriamento ou criopreservação do sêmen sejam capazes de manter a viabilidade seminal, sendo o resfriamento por horas ou dias, e a criopreservação por tempo indeterminado, esta técnica exige a aplicação de soluções crioprotetoras para que seja possível a sua estocagem.

Apesar de vários trabalhos já terem sido realizados com diferentes crioprotetores intra e extracelulares, foi observado que se obtém melhores resultados quando a criopreservação é realizada com a utilização dos dois em associação e a qualidade espermática após o descongelamento vai depender da boa execução do procedimento de congelamento. Além disso, é importante ressaltar que é necessário que se conheça a espécie que se pretende trabalhar, pois este procedimento pode variar entre elas.

LITERATURA CITADA

- BILLARD, R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, v.236, p.1-9, 2004.
- BILLARD, R.; LEGENDRE, M. Conservation a court terme des gamètes de truite arc en ciel en condition in vitro sous atmosphère d'oxygène. *Bulletin français de la pêche de la pisciculture*, v.284, p.162-167, 1982.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, v.172, p.1189-1190, 1953.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, v.26, p.623-635, 2010.
- CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Semen Viability of *Jundia*, *Rhamdia quelen*, Storage Under Refrigeration. *Revista Acadêmica*. V.4, p.11-16, 329 2006.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: *The Male Gamete*, v.16, p.161-186, 1999.
- CUERVAS-URIBE, R.; LEIBO, S. P.; DALY, J.; TIERSCH, T. R. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology*, v.63, p. 345 186-197, 2011.
- DAVY, F.B.; CHOUINARD, A. Induced fish breeding in southeast Asia: report of a workshop held in Singapore, v.48, p.25-28, 1980.
- FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; DRUMOND, M. M.;



- ROSA, P. V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 122, p. 259-263, 381 2010.
- GALO, J. M.; STREIT-JR. D. P.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; RESENDE, E. K.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R. P. Sperm quality of the Amazon catfish *Leicorhinus marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. *Brazilian Journal of Biology*, v.74, p.933-938, 2014.
- GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 390 v.31, p.351-360, 2007.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 2004. 393
- HE, S.; WOODS, L.C. Effect of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*, v.46, p.17-25, 396 2003.
- HENDERSON, N. E.; DEWAR, J. E. Short-term storage of brook trout milt. *The Progressive Fish Culturist*, v.21, p.169-171, 1959.
- KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. Características seminais do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.13, p.45-50, 1986.
- LE, M. H.; LIM, H. K.; MIN, B. H.; PARK, M. W.; CHANG, Y. J. Sperm cryopreservation of yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 21, p. 420 789-797, 2011
- LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F. C. E.; NUNES, L. T.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v.6, p.23-29, 2011.
- MARIA, A. N.; CARVALHO, A. C. M.; ARAUJO, R. V.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P.C. F.; AZEVEDO, H. C. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish sperm (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology*, p.109-114, 2015.
- MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.799-804, 2004.
- MARTÍNEZ, J. G.; CARRASCO, S. P. Criopreservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana*, v.15, p.3-23, 2010.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology/Cell Physiology*, p.125-142, 1984.
- MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRAO, R. N. Congelamento do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.27-57, 1982.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.526-531, 2007.
- OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; ISAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p.1509-1515, 2007.
- 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, p. 267-273, 2016.
- POUPARD, G. P.; PAXION, C.; COSSON, J.; JEULIN C.; FIERVILLE F.; BILLARD R. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, v.160, p.317-328, 1998.
- RODINA, M.; GELA, D.; KOCOUR, M.; HADI ALAVI, S. M.; HULAK, M.; LINHART, O. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos.



- Theriogenology, v.67, p.931-940, 2007.
- 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 congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*, v. 22, p. 255-268, 2012.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JR, M. V.; SILVA J. F.S.; SOUZA, G.; GODINHO, P., YASUI, G. S.; ANDRADE, C. C. F. Criopreservação do sêmen de *Brycon insignis* utilizando-se DMSO, glicose e gema de ovo a diferentes proporções de sêmen:dilente, avaliada pelo analisador de motilidade computadorizado. In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Vitória -ES. Anais: Palestras, 2004.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W. S.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, v.31, p.231-243, 2000.
- VIEIRA, M. J. A.F. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) e Criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104) 2010. 114 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2010.
- VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effect of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Bryconopalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, v. 78, p. 361-368, 2012.
- YOUNG, W. P.; FRENYEA, K.; WHEELER, P. A.; THORGAARD, G. H. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture*, v. 289, p. 13-18, 2009.
- WOYNAROVICH E. & HORVÁTH L. (1983) The artificial propagation of warm-water fishes - A manual for Extension (Portuguese). Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq.