



Conservação de gametas e embriões de peixes teleósteos

Preservation of gametes and embryo of teleost fish

Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley¹, Júlia Trugilio Lopes, Thais Maia Torres, Vanessa Alves Pereira, Liliane Veras Leite-Castro

Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

¹Correspondência: sandra.salmito@uece.br

Resumo

Objetivou-se com este manuscrito realizar uma breve revisão sobre técnicas de reprodução assistida utilizadas para peixes, apresentando uma visão geral sobre a conservação de gametas e embriões e os avanços tecnológicos já alcançados. Contextualizando com sua importância para a preservação de material genético e aplicação comercial.

Palavras chave: Ictiofauna, Indução hormonal, Criopreservação, Gametas, Embrião.

Abstract

The aim of this manuscript was to conduct a brief review about assisted reproduction techniques used to fish, presenting an overview of the gametes and embryos conservation and technological advances already achieved in this field. Contextualizing to their importance for the preservation of genetic material and commercial application.

Keywords: *Icthyofauna, Hormonal induction, Cryopreservation, Gametes, Embryo.*

Introdução

A produção/reprodução dos peixes vem sendo efetuada pelo homem desde os tempos imemoriais. De fato, segundo Fernandes Neto (2000), as primeiras inseminações assistidas em peixes foram relatadas no século XIV e em meados do século XVIII, tendo Blaxter congelado sêmen de peixes em 1953. Porém a capacidade técnica de conservação de células gaméticas e embriões de peixes só tem se expandido rapidamente nos últimos 30 anos, impulsionada, principalmente pela demanda por pescado, necessidade de melhoramento e manutenção da diversidade genética, além da conscientização social relacionada à não retirada de animais da natureza e à preservação de espécies em vias de extinção.

Neste manuscrito tem-se por objetivo realizar uma breve revisão sobre algumas biotécnicas de reprodução assistida, enfatizando-se a conservação de gametas e embriões de peixes teleósteos, mostrando a evolução e o estado de desenvolvimento em que as mesmas se encontram.

Técnicas de fertilização assistida

A fertilização assistida é uma etapa da reprodução assistida de peixes de suma importância para se testar os protocolos de conservação de sêmen e ovócitos.

A biotécnica pode ser realizada por dois métodos diferentes: o método úmido que se baseia na mistura de gametas masculinos e femininos coletados simultaneamente com água e o método a seco que mistura primeiramente os gametas acrescentando-se água em seguida. Esta última tem como vantagem o fato de se misturar o sêmen aos ovócitos previamente à colocação de meio ativador (água ou outra solução), portanto, os gametas já estarão juntos e, ao ocorrer a ativação, o espermatozoide não terá que percorrer uma longa trajetória até a micrópila. Isto permite ao inseminador utilizar uma menor proporção entre espermatozoide/ovócito.

Independente da técnica utilizada, seco ou úmida, há dois fatores importantes que contribuem para o sucesso da fertilização: a quantidade de água usada no momento da ativação e hidratação dos gametas (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007); e a dose inseminante. Esta última técnica economiza gametas, melhora a utilização do macho e contribui para um aumento da variabilidade genética (Nahiduzzaman et al., 2012; Leite et al., 2013; Salmito-Vanderley et al., 2014a).

Conservação de células espermáticas

Dentre as técnicas de conservação seminal destacam-se o resfriamento e a congelamento, ferramentas importantes na solução de problemas de assincronia reprodutiva, na simplificação do manejo dos reprodutores, no transporte de gametas e troca de material genético entre fazendas de piscicultura e em programas de

preservação de espécies ameaçadas de extinção (Godinho, 2007; Vieira et al., 2011).

O resfriamento é uma técnica simples que prolonga a viabilidade espermática em temperaturas em torno de 4°C (Dilauro et al., 1994) por horas ou dias. Os fatores que determinam o sucesso dessa técnica são: a redução da temperatura, o fornecimento e a troca de gases com o meio, a prevenção do desenvolvimento bacteriano e da dessecação (Stoss e Donaldson, 1982).

A técnica da congelação seminal pode ser dividida em três etapas: (1) exposição das células à solução crioprotetora; (2) regulação osmótica das células, buscando isotonicidade com o meio extracelular; (3) diminuição da temperatura, passando pelo ponto de congelação da água e da solução crioprotetora (Lezcano, 2001).

O sucesso da criopreservação pode variar de acordo com as soluções diluidoras, tipo de utensílio e equipamento utilizado, curva de congelação, tempo de equilíbrio, concentração de crioprotetores, taxas de diluição, taxas de descongelação, entre outros fatores (Melo-Maciél et al., 2012; Salmito-Vanderley et al., 2014b).

Para a congelação do sêmen é necessária a adição de uma solução diluidora, composta por diluente(s) e crioprotetor(es). O diluidor é responsável por manter a viabilidade da célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelação e descongelação seminal (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Já foram testados, com sucesso, como diluentes de sêmen de peixe a glicose (Lopes et al., 2014), Beltsville Thawing Solution® (Murgas et al., 2007), água de coco em pó (Leite et al., 2011), água de coco *in natura* (Farias et al., 1999), entre outros.

Os crioprotetores intracelulares são indispensáveis para o sucesso da congelação. Entre os crioprotetores permeáveis mais utilizados na congelação do sêmen de peixe podem ser citados o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etilenoglicol e, mais recentemente o metilglícol. A gema de ovo e o leite em pó, por sua atividade estabilizadora de membrana, são os usuais crioprotetores externos (Viveiros e Godinho, 2009; Salmito-Vanderley et al., 2012).

A combinação dos dois agentes (crioprotetores e diluentes) é bastante variável, o que torna muito difícil a tarefa de distinguir qual é o fator ideal para cada espécie, já que eles atuam de forma distinta.

Conservação ovocitária: importância, vantagens e desvantagens

Apesar do sucesso na elaboração de protocolos de resfriamento e criopreservação seminal de diversas espécies de peixes, poucos são os estudos acerca da conservação ovocitária, especialmente em relação à congelação de ovócitos, ainda não executada com sucesso.

A elucidação de protocolos eficazes de conservação de gametas femininos de peixe traria como benefícios a possibilidade de transporte de material genético entre fazendas de piscicultura, a conservação da diversidade genética e de linhagens de interesse por meio da criação de bancos de germoplasma, além da liberdade de se produzir alevinos no período de interesse, aumentando a disponibilidade de pescado e abrindo grandes possibilidades de mercado (Digmayer, 2013).

A conservação de ovocitária de peixes utilizando técnicas de resfriamento e congelação apresenta menor grau de dificuldade, quando comparada à conservação de embriões. Isso se deve ao tamanho reduzido dos ovócitos em relação aos embriões, menor sensibilidade a baixas temperaturas e à exposição a agentes crioprotetores e a ausência de uma membrana coriônica completamente formada, o que proporciona uma maior permeabilidade à água e a solutos (Streit Jr et al., 2014).

Entretanto, a conservação de ovócitos de peixes ainda enfrenta alguns obstáculos que impedem o sucesso dos protocolos de resfriamento e congelação.

Dentre os principais problemas causados aos gametas femininos por protocolos de resfriamento e congelação, podemos citar a toxicidade e choque osmótico provocados por agentes crioprotetores (Seki et al., 2011); desestabilização da membrana plasmática (Pearl e Arav, 2000); alterações na organização espacial do citoesqueleto; redução no estoque intracelular de ATP; danos irreversíveis às mitocôndrias e demais componentes do sistema energético vital da célula (Sanches et al., 2014).

Sabe-se ainda que a viabilidade dos ovócitos após o resfriamento depende de fatores como a temperatura a que eles serão expostos, o tempo de exposição a essas temperaturas, o estágio de desenvolvimento em que os ovócitos se encontram, além de fatores intrínsecos da fêmea (Isayeva et al., 2004).

Tomando o zebrafish como modelo experimental, os estádios de desenvolvimento ovocitário foram classificados em: estágio I - crescimento primário; estágio II - alvéolos corticais; estágio III - vitelogênico; estágio IV - em maturação; estágio V - ovos maduros (Selman et al., 1993). Diversos trabalhos já relataram que a sensibilidade dos ovócitos ao frio é menor nos estádios mais iniciais do desenvolvimento, especialmente os estádios I e II (Valdez Jr et al., 2005; Tsai e Lin, 2012; Godoy et al., 2013). Apesar de trazer vantagens, a utilização de ovócitos em estádios iniciais gera a necessidade de se desenvolver técnicas *in vitro* de maturação e vitelogênese (Tsai et al., 2009a). Técnicas estas ainda não dominadas.

Os trabalhos disponíveis na literatura acerca da conservação ovocitária de peixes relatam, em sua maioria, sobre a conservação a curto prazo por meio de resfriamento, visando principalmente elucidar o comportamento dos ovócitos frente à exposição aos crioprotetores, à redução de temperatura, ao tempo de exposição a esses fatores e a fase ovocitária utilizada. Os que buscam estabelecer protocolos de congelação,



apesar de trazerem informações importantes sobre as características criobiológicas dos ovócitos de peixe, ainda não foram bem sucedidos em gerar células ovocitárias viáveis após a descongelação.

Grande parte desses trabalhos utilizam como soluções base o cloreto de potássio tamponado, solução de Hank e meio L-15 (Leibovitz), associados, em geral, aos crioprotetores permeáveis metanol, etanol, propilenoglicol, DMSO e etilenoglicol, adicionados ou não dos crioprotetores não permeáveis sacarose, glicose, frutose e trealose (Tsai et al., 2009b; Seki et al., 2011; Digmayer, 2013; Godoy et al., 2013) empregados em experimentos de resfriamento, congelação lenta ou vitrificação.

A vitrificação de tecidos ovarianos também vem sendo estudada como ferramenta para a conservação ovocitária, entretanto, ainda não foram obtidos ovócitos viáveis, capazes de serem fertilizados e se desenvolverem até a eclosão das larvas (Godoy et al., 2013; Streit Jr., 2014).

Conservação de embriões

O desenvolvimento de protocolos eficazes de criopreservação de embriões de peixe apresenta-se como uma importante ferramenta de conservação de espécies ameaçadas de extinção, de manutenção dos estoques de pesca, bem como a criação de bancos genéticos (Janik et al., 2000). Apesar da atual atenção que a criopreservação de embriões de peixes tem atraído, os resultados ainda são inconclusivos (Ninhaus-Silveira et al., 2009), por isso o resfriamento tem sido uma alternativa à conservação dos mesmos e como veremos essa última vem trazendo informações elucidativas aos problemas encontrados durante a sua congelação.

O insucesso nesta criopreservação deve-se a alta sensibilidade da membrana à refrigeração, a formação de gelo intracelular durante o resfriamento lento, a elevada quantidade de vitelo e a elevada complexidade da membrana de embriões de peixe. Para superar estes obstáculos é fundamental aprofundar o conhecimento sobre a toxicidade, a permeabilidade e a concentração de crioprotetores, além da sua associação a soluções nutritivas, bem como refinar os protocolos de resfriamento já existentes.

Alguns dos crioprotetores utilizados atualmente foram relatados como moderadamente tóxicos (Bart e Kyaw, 2003; Zhang et al., 2005; Shalwei et al., 2014). Estudos demonstram a toxicidade dos crioprotetores em embriões de peixe (Bart e Kyaw, 2003; Zhang et al., 2004; Shalwei et al., 2013) e a permeabilidade nos mesmos (Shalwei et al., 2013).

Até meados de 1995, a maioria dos estudos apontavam o DMSO como o melhor crioprotetor pré-congelação (Adam et al., 1995), no entanto, atualmente o metanol e o propileno glicol também vem se destacando como crioprotetores menos tóxicos e com resultados promissores, em especial quando associados a sacarose, para algumas espécies (Fornari et al., 2012; Nascimento et al., 2014; Paes et al., 2014).

No primeiro trabalho brasileiro publicado sobre conservação de embriões, Streit Jr et al. (2007), testaram diversos crioprotetores no resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), e encontraram 69,2% de taxa de eclosão de larvas quando fez a associação de sacarose, metanol e água.

A congelação em si do embrião não tem mostrado resultados animadores (Fornari et al., 2012), em especial devido a observação de mortalidade embrionária pós-descongelação da ordem de 100%. Em parte atribuída à formação de cristais de gelo intraembrionária. Diante disto, para a criopreservação de embriões de peixes em nitrogênio líquido (~196°C) uma técnica que vem sendo proposta é a vitrificação (Robles et al., 2003, 2005), uma vez que, atingindo um estado vítreo, o embrião não passa por curva de resfriamento ou congelação, não havendo formação de cristais de gelo. Porém como o embrião precisa entrar em contato com uma mistura de crioprotetores em concentrações mais elevadas, isto leva a uma toxicidade maior ao embrião. Robles et al. (2003) observaram que na vitrificação de embriões de turbot, após a descongelação, 49% deles estavam normais, mas a medida que passava o tempo de incubação as morfoanormalias aumentavam.

Vale salientar que os embriões de peixes, sendo propensos a danos por choque térmico, podem ser fatalmente danificados dependendo da taxa de resfriamento, tipo e concentração de crioprotetor e, também, a fase embrionária em que o embrião se encontra na hora do resfriamento ou congelação influencia no sucesso da técnica. De fato, pela literatura, observa-se que o estágio embrionário das diferentes espécies de peixes possui particularidades quanto a permeabilidade de suas membranas e à sensibilidade ao frio. Em *Danio rerio* (Hagedorn et al., 1997) e em *Carassius auratus* (Liu et al., 1993) demonstram ser os embriões em estádios iniciais de desenvolvimento os mais sensíveis as crio-injúrias, e os estádios de pós-gastrulação os menos afetados pelo frio.

Trabalhos têm sido conduzidos injetando aquaporinas nos embriões no intuito de aumentar a permeabilidade de membrana e também de proteínas anti-congelantes, para aumentar a resistência da célula ao frio (Martínez-Paramo et al., 2009).

Portanto, para o sucesso na conservação de embriões devem-se conhecer as características morfofisiológicas dos mesmos assim como a sua cronologia e como se dá sua interação com os meios de criopreservação. Deve-se descobrir se os embriões de determinada espécie suportam a redução de temperaturas (direta ou indireta); qual a curva ideal de queda da temperatura; qual a fase do desenvolvimento embrionário é mais propícia fazê-lo; e mesmo a toxicidade provocada pela interação de diluente/crioprotetor, este sendo fator fundamental para o domínio da técnica.



Considerações finais

A criopreservação de sêmen de peixes está bem estabelecida para várias espécies. No entanto, os protocolos destinados à conservação de ovócitos e embriões de peixes teleósteos ainda não estão definidos. O apanhado bibliográfico mostrou também que há variação espécie-específica na resposta aos vários protocolos biotecnológicos e, por isso, a otimização da utilização de qualquer uma das metodologias supra descritas necessita do conhecimento da biologia reprodutiva a cada nova espécie estudada.

Referências

- Adam MM, Rana KJ, McAndrew, BJ.** Effect of cryoprotectants on activity of selected enzymes in fish embryos. *Cryobiology*, v.32, p.92-104, 1995.
- Bart AN, Kyaw HA.** Survival of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), embryo after immersion in methanol and exposure to ultrasound with implications to cryopreservation. *Aquacult Res*, v.34, p.609-615, 2003.
- Digmayer M.** Influência da baixa temperatura e diferentes crioprotetores em oócitos e embriões de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*. 2013. 48f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2013.
- Dilauro MN, Krise WF, Hendrix MA, Baker SE.** Short term storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish Culturist*, v.56, p.143-144, 1994.
- Farias JO, Nunes JF, Carvalho MAM, Salgueiro CCM.** Avaliação in vitro e in vivo do sêmen do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. v.1, p.44-58, 1999.
- Fernandes Neto TB.** A reprodução assistida em face da bioética e do biodireito: aspectos do direito de família e do direito das sucessões. Florianópolis: Editora Diploma Legal, 2000. 140p.
- Fornari DC, Ribeiro RP, Streit Jr. DP, Vargas L, Godoy LC, Oliveira CAL, Digmayer M, Galo JM, Neves PR.** Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. *Cryo Lett*, v.33, p.125-133, 2012.
- Godinho HP.** Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.351-360, 2007.
- Godoy LC, Streit Jr DP, Zampolla T, Bos-Mikich A, Zhang T.** A study on the vitrification of stage III stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, v.67, p.347-354, 2013.
- Hagedorn, M, HSU E, Kleinhans FW, Wildt DEN.** New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. *Cryobiology*, v.34 p.335-347, 1997.
- Isayeva A, Zhang T, Rawson DM.** Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*, v.49, p.114-122, 2004.
- Janik, M, Kleinhans FW, Hagedorn M.** Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology*, v. 41, p.25-34. 2000.
- Leite LV, Melo MAP, Oliveira FCE, Pinheiro JPS, Campello CC, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB.** Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.65, p.421-429, 2013.
- Leite LV, Oliveira FCE, Nunes LT, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB.** Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. *Rev Bras Eng Pesca*, v.6, p.23-29, 2011.
- Lezcano M.** Evaluación de cuatro agentes crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides, masa y suspensión espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). 2001. 115f. Monografía (Graduação em Biologia Marinha) - Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 2001.
- Liu K, Chou T, Lin H.** Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. *Aquat Living Resour*, v.6, p.145-153, 1993.
- Lopes JT.** Caracterização seminal e avaliação de diferentes protocolos de criopreservação sobre a qualidade espermática de curimatã comum (*Prochilodus brevis*). 2014. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.
- Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cerezales S, Robles V, Herráez MP.** Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, v.58, p.128-133, 2009.
- Melo-Macieli MAP, Salmito-Vanderley SCB, Leite LV, Oliveira FCE, Oliveira MS, Lopes JT, Nunes JF.** Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. *Ciênc Anim*, v.22, p.269-283, 2012.
- Murgas LDS, Millorini AB, Freitas RTF, Pereira GJM.** Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.526-531, 2007.
- Nahiduzzamana M, Hassanb M, Roya PK, Hossainc A, Hossaina MAR, Tiersch TR.** Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing



- rates on egg fertilization. *Anim Reprod Sci*, v.136, p.133-138, 2012.
- Nascimento RV, Oliveira MS, Leite LV, Linhares FRA, Vieira MJAF, Salmito-Vanderley CSB.** Efeito do resfriamento sobre embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta Vet Bras*, v.8, supl.2, p.219-220, 2014.
- Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Azevedo A, Agostinho CA, Veríssimo-Silveira R.** Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote*, v.17, p.45-55, 2009.
- Paes MCF, Silva RC, Nascimento NF, Valentin FN, Senhorini JA, Nakaghi LSO.** Hatching, survival and deformities of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos subjected to different cooling protocols. *Cryobiology*, v.69, p.451-456, 2014.
- Pearl M, Arav A.** Chilling sensitivity in zebrafish (*Brachiodanyo rerio*) oocyte is related to lipid phase transition. *Cryo Lett*, v.21, p.171-178, 2000.
- Robles V, Cabrita E, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Herráez MP.** Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-artic fish species. *Theriogenology*, v.64, p.1633-1646, 2005.
- Robles V, Cabrita E, Real M, Álvarez R, Herráez MP.** Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology*, v.47, p.30-39, 2003.
- Salmito-Vanderley CSB, Linhares FRA, Carvalho MAM, Oliveira MS, Nunes FN.** Biotécnicas aplicadas a reprodução de ciprinídeos. *Acta Vet Bras*, v.8, supl.2, p.292-298, 2014a.
- Salmito-Vanderley CSB, Pinheiro JPS, Almeida PS, Lopes JT, Leite LV.** Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. *Acta Vet Bras*, v.8, p.343-350, 2014b.
- Salmito-Vanderley CSB, Vieira MJAF, Leite LV, Oliveira FCE, Linhares FRA, Salgueiro CCM, Nunes JF.** Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciênc Anim*, v.22, p.255-268, 2012.
- Sanches EA, Okawara RY, Caneppele D, Neumann G, Bombardelli RA, Romagosa E.** Storage of Steindachneridion parahybae oocytes at different temperatures. *Anim Reprod Sci*, v.151, p.262-268, 2014.
- Seki S, Kouya T, Tsuchiya R, Valdez Jr DM, Jin B, Koshimoto C, Kasai M, Edashige K.** Cryobiological properties of immature zebrafish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. *Cryobiology*, v.62, p.8-14, 2011.
- Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X.** Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachio rerio*. *J Morphol*, v.218, p.203-224, 1993.
- Shaluei F, Imanpoor MR, Shabani A, Nars-Esfahani MH.** Effect of different concentrations of permeable and non-permeable cryoprotectants on hatching rate of goldfish (*carassius auratus*) embryos. *Asian Pacific J Reprod*, v.2, p.185-188, 2013.
- Stoss J, Donaldson EM.** Preservation of fish gametes. In: International Symposium Reproduction Physiology Fish, 1982, xxx. Proceedings... Wageningen: 1982. p.114-122.
- Streit Jr DP, Godoy LC, Ribeiro RP, Fornari DC, Digmayer M, Zhang T.** Cryopreservation of embryos and oocytes of South american fish species. In: Yamashiro H (Org.). Recent advances in cryopreservation. Croatia: Intech, 2014. Cap.3.
- Streit Jr. DP, Digmayer M, Ribeiro RP, Sirol RN, Moraes GV, Galo JM.** Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesq Agropec Bras*, v.42, p.1199-1202, 2007.
- Tsai S, Lin C.** Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Braz Arch Biol Technol*, v.55, p.425-433, 2012.
- Tsai S, Rawson DM, Zhang T.** Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology*, v.71, p.1226-1233, 2009a.
- Tsai S, Rawson DM, Zhang T.** Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, v.58, p.279-286, 2009b.
- Valdez Jr MD, Miyamoto A, Hara T, Edashige K, Kasai M.** Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, v.64, p.112-122, 2005.
- Vieira MJAF, Carvalho MAM, Salmito-Vanderley CSB, Salgueiro CCM, Viveiros ATM, Moura AAAN, Nunes JF.** Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. *Arch Zootec*, v.60, p.1263-1270, 2011.
- Viveiros ATM, Godinho HP.** Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem*, v.35, p.137-150, 2009.
- Zaniboni Filho E, Weingartner M.** Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.367-373, 2007.
- Zhang T, Isayeva A, Adams SL, Rawson DM.** Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, v.50, p.285-293, 2005.
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YJ, Hu JH, Xu YY, Li J, Chen SL.** Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys livaceus*) embryos. *Theriogenology*, v.63, p.763-773, 2004.