



Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros

Semen and tissues freezing in Brazilian fish

Evoy Zaniboni-Filho^{1,3}, Bernardo Baldisserotto²

¹Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³Correspondência: evoy@lapad.ufsc.br

Resumo

Neste trabalho é apresentada uma revisão dos principais procedimentos adotados para a conservação da viabilidade do sêmen de diferentes espécies de peixes, com ênfase nos peixes nativos do Brasil, bem como, destaca alguns dos principais avanços obtidos na congelação de embriões e tecidos de peixes.

Palavras-chave: congelação lenta, criopreservação, espermatozoides, resfriamento.

Abstract

This paper presents a review of the main procedures adopted for the conservation of the viability of semen from different fish species, with emphasis on native fish species from Brazil, and highlights some of the major advances obtained in freezing fish embryos and tissues.

Keywords: cooling, cryopreservation, slow freezing, sperm.

Introdução

A congelação do sêmen de peixes foi obtida com sucesso nos anos 50 (Blaxter, 1953), sendo atualmente viável para um grande número de espécies de peixes. Apesar disso, a variação das características do sêmen entre espécies exige alteração dos protocolos de manejo para congelação e posterior utilização do sêmen dos peixes. O desenvolvimento das técnicas de congelação do sêmen de peixes tem sido feito frequentemente com base em testes espécie-específico, apresentando resultados muito heterogêneos mesmo comparando os resultados obtidos com uma mesma espécie (Viveiros e Godinho, 2009).

Os gametas dos peixes após a espermiacão e desova apresentam uma rápida perda de viabilidade, necessitando serem prontamente utilizados. Esta característica varia bastante entre as espécies de peixes e é ainda mais acentuada nos óvulos. Dessa forma, houve interesse no desenvolvimento de técnicas para o prolongamento da viabilidade dos gametas, consistindo principalmente na refrigeração e na congelação (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). Enquanto a refrigeração do sêmen amplia o período de vida dos gametas por algumas horas ou dias, a congelação permite ampliar a viabilidade por vários anos (Billard et al., 2004).

O prolongamento do tempo de viabilidade do sêmen de peixes tem muitas vantagens para aplicação na aquicultura, tais como redução da incerteza de sincronia entre a ovulação e a espermiacão dos reprodutores durante o manejo de indução à reprodução, a redução de custos e a maior facilidade para aplicação de programas de seleção e melhoramento genético (Harvey e Carolsfeld, 1993; Carneiro, 2007). Uma aplicação importante da congelação de sêmen é a possibilidade de implantar bancos de sêmen criopreservados, de modo a assegurar a manutenção da variabilidade genética de estoques selvagens ou de linhagens selecionadas para uso na aquicultura (Harvey e Carolsfeld, 1993, Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004).

Enquanto o embrião de várias espécies de mamíferos tem sido congelado e descongelado com sucesso, persistem as dificuldades técnicas para a congelação de embriões de peixes, répteis, anfíbios e aves.

O presente trabalho faz uma revisão dos principais procedimentos adotados para a conservação da viabilidade do sêmen de diferentes espécies de peixes, com ênfase nos peixes nativos do Brasil, bem como, destaca os principais avanços obtidos na congelação de embriões e tecidos de peixes.

Avaliação da qualidade espermática

A qualidade do sêmen pode variar com a idade, o estado fisiológico e a condição nutricional dos peixes, sendo inclusive variável, de acordo com Harvey e Carolsfeld (1993), ao longo do período reprodutivo. Essa variação na qualidade espermática exige que sejam utilizados métodos de avaliação da qualidade do sêmen antes da aplicação das técnicas de prolongamento da vida dos espermatozoides. Essas mesmas técnicas têm sido utilizadas para avaliar a qualidade do sêmen após o tratamento de resfriamento ou congelação. Fauvel et al.

(2010) realizaram uma extensa revisão sobre os métodos de análise da qualidade do sêmen de peixes, fazendo inclusive uma comparação detalhada das diferentes técnicas que têm sido utilizadas para estimar cada um dos parâmetros seminais. Nessa revisão foram listados os principais parâmetros que têm sido utilizados para qualificar o sêmen: concentração espermática, morfologia espermática, motilidade (duração e quantificação), integridade de membrana e conteúdo de energia.

A concentração espermática é facilmente obtida através de várias técnicas de análise, como a contagem feita diretamente sob microscópio, uso da espectrofotometria ou da citometria de fluxo e através da determinação do espermatócrito. A morfologia espermática tem sido utilizada principalmente para identificar e quantificar as deformidades ou anomalias dos espermatozoides, sendo avaliada diretamente sob microscópio ou ainda com o auxílio de programas específicos para análise de imagem. A avaliação da motilidade espermática pode ser feita diretamente pela análise de uma alíquota de sêmen disposta numa lâmina sob microscópio, fornecendo uma análise subjetiva da qualidade do sêmen pela duração da motilidade espermática e pela porcentagem de espermatozoides móveis. Atualmente está em uso crescente a estimativa da motilidade espermática com o uso de programas computacionais específicos, como o CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que utiliza a análise integrada de várias imagens sucessivas obtidas do movimento dos espermatozoides, possibilitando obter informação individual da velocidade de deslocamento e da trajetória percorrida pela cabeça de cada espermatozoide. A integridade da membrana espermática tem sido utilizada como indicador da quantidade de espermatozoides vivos e mortos. Essa técnica está baseada no fato de haver alteração na permeabilidade da membrana para determinados íons quando ocorre a morte celular. Dessa forma, o uso de corantes específicos aplicados sobre o sêmen permite identificar espermatozoides vivos e mortos pela avaliação direta sob microscópio, tais como a eosina/nigrosina. A motilidade espermática é sustentada pela hidrólise de ATP, de modo que a avaliação da quantidade de ATP celular pode indicar a quantidade de energia disponível para sustentar a motilidade e a viabilidade espermática. Essa avaliação do conteúdo de ATP pode ser feita com diferentes técnicas, tais como através do uso de HPLC ou através de bioluminescência.

A concentração e a motilidade espermática têm sido largamente utilizados para caracterizar espermatozoides de forma rápida e subjetiva, enquanto que a espectrofotometria ou o uso da análise de imagens e do CASA oferecem essas informações de forma rápida, objetiva e a um baixo custo (Fauvel et al., 2010).

Resfriamento do sêmen

O resfriamento consiste na manutenção dos gametas em baixas temperaturas, porém acima da temperatura de congelamento. Tem sido utilizada a temperatura entre 3 a 5°C para conservar os gametas de peixes, porém com melhores resultados na manutenção de espermatozoides que de óvulos. Os resultados variam bastante entre as distintas espécies e protocolos utilizados, podendo ser armazenados diretamente após a espermição ou diluídos em solução-tampão. O tempo de conservação pode ser de poucas horas até vários dias.

O resfriamento do sêmen de carpa comum *Cyprinus carpio* utilizando diferentes temperaturas de resfriamento e distintas soluções de diluição demonstra que a temperatura de 5°C apresenta melhores resultados que 2°C, além do que, a qualidade do sêmen se manteve inalterada nas primeiras 20 horas, quando passou a ocorrer uma gradativa perda de qualidade (Ravinder et al., 1997).

Dentre os peixes nativos utilizados na piscicultura brasileira, alguns poucos experimentos sumarizados por Zaniboni-Filho e Nuñez (2004) demonstram a viabilidade para o resfriamento do sêmen. A motilidade mínima de 30% do sêmen sem diluição é mantida após 7 h em piapara (*Leporinus elongatus*) e 29 h em pacu (*P. mesopotamicus*), enquanto que o sêmen da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) mantido sem diluição em temperatura de 4°C mantém qualidade inalterada até o terceiro dia. Os melhores resultados observados para o sêmen da piava (*L. obtusidens*) foram obtidos após a diluição em solução de BTS 5% + KCl 0,16% + DMSO 10%. Talvez o resultado mais relevante tenha sido obtido por Carneiro et al. (2007), quando o sêmen de jundiá *Rhamdia quelen* mantido sobre refrigeração (5,7°C), durante 12 dias, proporcionou a fertilização igual ou superior a 50%. Outra informação importante foi obtida por Sanches et al. (2013), quando testando diferentes temperaturas de estocagem do sêmen de jundiá verificaram que a temperatura da água utilizada na ativação espermática exerce influência sobre os resultados da motilidade espermática.

Os resultados obtidos com o resfriamento de ovócitos são bastante variáveis, quase sempre apresentando desempenho ruim. Os ovócitos de *Brycon siebenthalae* (= *B. amazonicus*) apresentam prejuízo na qualidade quando armazenados a 4°C por tempo superior a 30 minutos, sendo preferível que sejam mantidos em temperatura ambiente ou mesmo dentro da cavidade ovariana (Velasco-Santamaria et al., 2003). Recentemente foi testado com sucesso o armazenamento de ovócitos de truta mantidos em sacos plásticos selados (Komrakova e Holtz, 2011), se tratam de sacos plásticos utilizados para congelamento de alimentos que são preenchidos com ovócitos, sem a drenagem do fluido ovariano, e mantidos à 2°C. Esses autores obtiveram taxa de fertilização superior a 50% depois de 20 dias de estocagem. De acordo com Bahabadi et al. (2011), o fluido ovariano é a solução que apresenta o melhor resultado para manter viáveis os ovócitos refrigerados de truta arco-íris *Onchorynchus mykiss* dentre várias soluções testadas para essa finalidade.

Congelamento do sêmen

A congelamento consiste na preservação dos gametas em temperaturas inferiores a do ponto de fusão da água, quando pode ocasionar a formação de cristais de gelo. Quando a congelamento é feita lentamente, após abaixar de 0°C, começa a formar gelo fora da célula e há um gradativo aumento da concentração osmótica no meio extracelular, promovendo uma saída passiva de água do interior das células. Caso a congelamento seja muito lenta a célula pode desidratar-se o bastante para que não ocorra a congelamento intracelular propriamente dita. Normalmente a desidratação da célula é insuficiente para evitar a formação de gelo no seu interior e ocorrem danos fatais, a menos que sejam adotadas medidas para protegê-las. Uma prática recomendável é a utilização de crioprotetores intracelulares, que consistem em substâncias químicas atóxicas que auxiliam na desidratação das células e reduzem a temperatura de congelamento do seu interior. As substâncias mais utilizadas para esse fim são o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol e o glicerol (Viveiros e Godinho, 2009). Há ainda a necessidade do uso de crioprotetores extracelulares que recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana para evitar os danos causados pela congelamento. Os mais utilizados são a gema de ovo fresco e leite em pó (Carolsfeld et al., 2003).

Um diluente básico e que apresenta excelente resultado para sêmen de vários peixes tropicais de água doce consiste na mistura de 10% DMSO, 5% glicose, 10% gema de ovo e 150 ml de água destilada. A mistura deve ser feita inicialmente juntando DMSO, glicose e água, com a inclusão da gema do ovo minutos antes da sua utilização. A mistura do DMSO com a água produz uma reação exotérmica que deve resfriar até a temperatura ambiente antes da inclusão da gema de ovo (Carolsfeld et al., 2003).

Vários outros diluentes têm sido testados para tentar melhorar os resultados obtidos com essa solução básica, tais como o glicerol-salino utilizado para o sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus*, que mostrou resultados semelhantes aos observados pela solução derivada dessa mistura convencional (DMSO + sacarose) (Lanes et al., 2008). Recentemente houve a produção comercial do leite de coco em pó (ACP), um produto padronizado e estável. Há resultados muito animadores do uso do ACP para a criopreservação do sêmen de algumas espécies de peixes sul-americanos (piracanjuba, piava *Leporinus obtusidens* e curimatá *Prochilodus lineatus*; Viveiros et al., 2008), porém, o uso do ACP não apresentou melhor resultado para o sêmen do dourado *Salminus brasiliensis* que aquela convencionalmente utilizada à base de DMSO (Zanandrea et al., 2014). Nesse trabalho com dourado, os autores evidenciaram que havia melhoria na qualidade do sêmen criopreservado com o aumento da quantidade da solução crioprotetora à base do ACP, porém com resultado nunca superior ao obtido pela solução à base de DMSO.

Outro diluente, distinto daquele contendo DMSO, é o mais recomendado para a preservação do sêmen dos bagres sul-americanos surubim e pintado (*Pseudoplatystoma* spp.), que consiste na mistura de 10% metanol, 10% glicose, 5% leite em pó em 100 ml de água destilada (Carolsfeld et al., 2003). Todas essas soluções devem ser misturadas numa proporção de 3 a 4 partes para cada uma de sêmen.

Congelamento pelo método convencional

Existem apenas dois métodos práticos utilizados para a congelamento de tecidos animais, o gelo seco (-79°C) e o nitrogênio líquido (-196°C). As células podem ser resfriadas em gelo seco, porém a conservação em longo prazo deve ser feita numa temperatura inferior a -180°C. Existem recipientes com vapor de nitrogênio líquido, normalmente utilizados para o transporte de tecidos criopreservados, que são muito práticos para o trabalho de congelamento.

A velocidade de congelamento apresenta importância determinante no sucesso dessas técnicas de criopreservação. Os melhores resultados na congelamento do sêmen de peixes migradores sul-americanos, de acordo com Carolsfeld et al. (2003), têm sido obtidos com uma rápida congelamento até a temperatura de -8°C (60 s), mantendo por cerca de 40 s neste platô de temperatura e seguindo novamente numa rápida velocidade de congelamento até -150°C (taxa de congelamento de -45°C/min) e finalmente uma estabilização até a temperatura de -190°C, levando cerca de 7 min desde o início até completar todo processo. As taxas de congelamento acima mencionadas, indicadas por Carolsfeld et al. (2003) para a criopreservação do sêmen de peixes, são obtidas com a utilização de botijão Taylor-Wharton CP 300 dry shipper e com o uso de palthetas com volume de 0,5 ml.

Caso haja necessidade do uso de nitrogênio líquido diretamente para a criopreservação do sêmen de peixes, Chen et al. (2004) descrevem os passos que devem ser seguidos para manter a velocidade de congelamento dentro dos limites toleráveis, recomendando um tempo de aclimação antes da imersão no nitrogênio líquido - manter as palthetas colocadas 6 cm acima da superfície do nitrogênio líquido por 10 min, depois mantê-las a 1 cm da superfície por 5 min e somente depois imergi-las no nitrogênio líquido. Os danos causados pela congelamento do sêmen podem resultar numa ativação dos espermatozoides durante a descongelamento, reduzindo tão drasticamente o tempo de vida que pode até anular a capacidade de fertilização (Harvey e Carolsfeld, 1993). A rápida descongelamento seguida da imediata utilização do sêmen para fertilização pode mitigar o efeito desses danos (Horton e Ott, 1976).

Uma revisão feita por Viveiros e Godinho (2009), avaliando os procedimentos adotados para a descongelamento do sêmen criopreservado de peixes sul-americanos, revela que os melhores resultados são obtidos

quando as amostras criopreservadas são imersas em água a temperatura ambiente ou ligeiramente aquecida (máximo de 60°C). A ativação do sêmen submetido a congelamento com as soluções crioprotetoras acima listadas, tem apresentado os melhores resultados de motilidade e vigor quando feita imediatamente depois da descongelamento e com a utilização de solução salina (NaCl 0,9% ou 0,45%) ou ainda, com bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 1%; Carolsfeld et al., 2003).

O procedimento acima descrito foi testado para o sêmen de curimatá com resultados de fertilização dos ovos semelhante aos obtidos com o uso de sêmen fresco, maior que 60% de fertilização (Silva, 2000). Outros testes foram realizados com peixes migradores sul-americanos, entre eles: dourado, pintado, piracanjuba, piapara e pacu, com excelentes resultados de fertilização, variando entre 49 e 300% em relação àqueles obtidos nos tratamentos com sêmen fresco (Carolsfeld et al., 2003).

Nos trabalhos de criopreservação do sêmen de mamíferos tem sido recomendado o uso de substâncias antioxidantes incluídas nas soluções crioprotetoras, de modo a reduzir a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que são abundantes nas membranas celulares (Askari et al., 1994; Monteiro et al., 2009). Esses autores obtiveram aumento na motilidade do sêmen de humanos e de cachorros, respectivamente, quando incluíram vitamina E e/ou glutatona redutase na solução crioprotetora. Dentre os poucos testes realizados com a inclusão desses antioxidantes na criopreservação do sêmen de peixes, como os realizados com curimatá (Paula et al., 2012), não mostraram efeito benéfico sobre a qualidade do sêmen criopreservado.

O efeito da alimentação dos reprodutores sobre a qualidade do sêmen criopreservado foi comprovada por Mataveli et al. (2007), que complementando a dieta de tilápia do Nilo com 300 mg de vitamina C, durante cinco meses, obtiveram redução da taxa de deformidade espermática após descongelamento, quando comparado ao obtido por peixes não suplementados, mantendo os demais parâmetros espermáticos qualitativos semelhantes.

Vitrificação

A vitrificação consiste na criopreservação livre de gelo, utilizando crioprotetores concentrados e elevadíssimas taxas de resfriamento (Rall e Fahy, 1985). A técnica de vitrificação já é utilizada com sucesso para a criopreservação de ovócitos de humanos e de alguns animais domésticos (Saragusty e Arav, 2011), apesar disso, poucos estudos têm sido feitos com peixes. Os estudos com ovócitos de zebrafish (*Danio rerio*) evidenciaram danos nas estruturas causadas pela criopreservação (Guan et al., 2010; Godoy et al., 2013). Dentre esses, os melhores resultados foram obtidos por Godoy et al. (2013), quando cerca de 60% dos folículos ovarianos vitrificados (ovócitos em estágio III) apresentavam as membranas celulares íntegras após a descongelamento, apesar disso, com danos visíveis nas mitocôndrias contidas nas células da granulosa. O resultado mais promissor com o uso da vitrificação para congelamento do embrião de peixes foi obtido com o esturjão Persa (*Acipenser persicus*), onde 69% dos embriões submetidos à congelamento, 48 horas após a fertilização, completou o desenvolvimento embrionário e eclodiu (Keivanloo e Sudagar, 2013).

Avanços na congelamento de sêmen, ovócitos e embriões de peixes

Os protocolos para a criopreservação de sêmen já estão definidos e têm evoluído para técnicas muito práticas, possibilitando o seu uso na aquicultura e como ferramenta na conservação da diversidade genética dos estoques de peixes (Carolsfeld et al., 2003). Apesar da falta de sucesso expressivo na criopreservação de embriões, há avanços significativos que permitem conhecer as fases mais indicadas para a conservação dessas células, além do que, alguns tecidos dos embriões terem podido ser criopreservados com sucesso. Os entraves estão associados à impermeabilidade da camada sincicial do vitelo (Ninhaus-Silveira, 2004), de modo que a congelamento de embriões de peixes ainda é considerada inviável (Tsai e Lin, 2012).

Diante da dificuldade para congelamento de embriões de peixes, uma alternativa que tem sido utilizada para a criopreservação da informação genética das fêmeas é a congelamento de ovócitos. Na comparação com os embriões, os ovócitos apresentam ausência de córion completamente formado, menor tamanho (maior relação superfície/volume) e maior permeabilidade de membrana, fatores que favorecem o sucesso da criopreservação (Tsai et al., 2009). A possibilidade de transplante bem sucedido de espermatogônias entre diferentes espécies de peixes, de acordo com Yoshizaki et al. (2011), permite armazenar espermatogônias criopreservadas para que possam ser convertidas em ovócitos e espermatozoides funcionais através de transplante. Essa técnica pode ser de grande utilidade em programas de seleção e na conservação dos recursos genéticos de espécies ameaçadas de extinção.

Referências

- Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. Arch Androl, v.3, p.11-15, 1994.
- Bahabadi MN, Shoae A, Lokman PM. Effects of storage time, sex steroids and media composition on egg viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v.315, p.306-311, 2011.



- Billard RJ, Cosson, SB, Noveiri M.** Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, v.236, p.1-9, 2004.
- Blaxter JHS.** Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, v.172, p.1189-1190, 1953.
- Carneiro PCF.** Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.361-366, 2007.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey B.** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol*, v.63, p.472-481, 2003.
- Chen SL, Ji XS, Yu GC, Tian YS, Sha ZX.** Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, v.236, p.547-556, 2004.
- Fauvel C, Suquet M, Cosson J.** Evaluation of fish sperm quality. *J Appl Ichthyol*, v.26, p.636-643, 2010.
- Godoy LC, Streit DP, Zampolla T, Bos-Mikich A, Zhang T.** A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, v.67, p.347-354, 2013.
- Guan, M, Rawson, DM, Zhang, T.** Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *CryoLett*, v.31, p.230-238, 2010.
- Harvey B, Carolsfeld J.** Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: IDRC, 1993.
- Horton HF, Ott AG.** Criopreservação de fish spermatozoa and ova. *J Fisher Res Board Canada*, v.33, p.995-1000, 1976.
- Keivanloo S, Sudagar M.** Feasibility studies on vitrification of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) Embryos. *J Aquac Res Dev*, v.4, p.100172, 2013.
- Komrakova M, Holtz W.** Storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in sealed polyethylene (PE) bags. *Aquaculture*, v.313 p.65-72, 2011.
- Lanes CFC, Okamoto M, Cavalcanti PV, Collares T, Campos VF, Deschamps JC, Robaldo RB, Marins LF, Sampaio LA.** Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*). *Aquaculture*, v.275, p.361-365, 2008.
- Mataveli M, Moraes GV, Streit Jr. DP, Vargas LD, Sakaguti, ES, Toninato JC, Barbosa RC, Merlini L.** Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina. *Bol Inst Pesca*, v.33, p.1-7, 2007.
- Monteiro JC, Gonçalves JSA, Rodrigues JA, Lucio, CF, Silva LCG, Assumpção MEOA, Vannucchi CI.** Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen thawed canine semen. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.359-362, 2009.
- Ninhaus-Silveira, A.** Desenvolvimento embrionário e preservação criogênica de embriões do curimatã, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836; Teleostei; Prochilodontidae). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - UNESP, Botucatu, 2004.
- Paula DAJ, Andrade ES, Murgas LDS, Felizardo VO, Winkaler EU, Zeviani W, Freitas RTF.** Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop Ichthyol*, v.10, p.661-665, 2012.
- Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, v.24, p.387-402, 1985.
- Ravinder K, Nasaruddin K, Majumdar KC, Shivaji S.** Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *J Fish Biol*, v.50, p.1309-1328, 1997.
- Sanches EA, Neumann G, Toledo CPR, Bombardelli RA, Piana PA, Romagosa E.** Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquacult Res*, v.44, p.534-541, 2013.
- Saragusty J, Arav A.** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, v.141, p.1-19, 2011.
- Silva EB.** Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - UFSC, Florianópolis, 2000.
- 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, 2009.
- Velasco-Santamaría YM, Corredor-Santamaría W, Cruz-Casallas PE.** Variation of eggs fertility of yamu *Brycon siebenthalae*, during short-term storage. In: Congress of the World Aquaculture Society 2003. Salvador. Abstracts...Salvador: WAS, 2003. (Resumo).
- Viveiros ATM, Godinho HP.** Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem*, v.35, p.137-150, 2009.
- Viveiros ATM, Maria AN, Órfão LH, Carvalho MA, Nunes JF.** Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. *Cybium*, v.32, n.2, suppl.), p.215, 2008.



Yoshizaki G, Fujinuma K, Iwasaki Y, Okutsu T, Shikina S, Yazawa R, Takeuchi Y. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comp Biochem Physiol Part D*, v.6, p.55-61, 2011.

Zanandrea ACV, Weingartner M, Zaniboni-Filho E. Use of ACP-104 at Different Dilutions for Sperm Cryopreservation of Dourado, *Salminus brasiliensis*. *J World Aquacult Soc*, v.45, p.82-87, 2014.

Zaniboni-Filho E, Nuñez APO. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo, SP: TecArt, 2004. p.45-73.
