



Resfriamento e criopreservação em invertebrados aquáticos: aspectos relevantes

Cooling and cryopreservation in aquatic invertebrates: relevant aspects

A.V.L. Ferreira¹, M.L.N.M. Sousa¹, A.A. Soares Filho³, C.M.S. Sampaio^{1,2,4}

¹Faculdade Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

³Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

Correspondência: celia.sampaio@uece.br

Resumo

A biotecnologia que envolve as técnicas de resfriamento e criopreservação pode permitir a conservação de material genético e ser utilizada para preservação de desovas de animais ameaçados de extinção. No entanto, o sucesso da aplicação dessas técnicas abrange o entendimento da ação de diluidores, fluxo e influxo de agentes crioprotetores, toxicidade, curvas de resfriamento, além dos processos de congelamento e descongelamento. Também é importante levar em consideração que a influência de todos esses fatores varia dentre as diversas espécies de animais. Assim, este artigo sistematiza os recentes avanços no resfriamento e na criopreservação de invertebrados aquáticos de interesse comercial.

Palavras-chave: agentes crioprotetores, armazenamento criogênico, gametas, embriões, larvas.

Abstract

Biotechnology involving cooling and cryopreservation techniques can allow the preservation of genetic material and be used to preserve spawning of endangered animals. However the application of these techniques successfully includes understanding extenders action, flux and influx of cryoprotectants agents as well as their toxicity, cooling, plus the process of freezing/thawing until reaching the freezing itself, considering that the influence of all these factors varies among the various species of animals. Thus, this article systematizes recent advances in cooling and cryopreservation of aquatic invertebrates commercially interesting.

Key words: cryogenic storage, cryoprotectant agents, gametes, embryos, larvae.

Introdução

O armazenamento criogênico de embriões e gametas de mamíferos é amplamente difundido e alvo de diversas pesquisas (Moussa et al., 2014), porém na aquicultura ainda é incipiente quando comparado ao de outros animais de interesse zootécnico (Vuthiphandchai et al., 2007).

Para invertebrados aquáticos, a biotecnologia envolvida na técnica de resfriamento é uma alternativa para o armazenamento de material biológico, assegurando a produção comercial e a preservação dos estoques naturais das espécies voltadas para o cultivo (Newton e Subramoniam, 1996).

Considerando a importância de diversos grupos de invertebrados aquáticos para a pesca artesanal e para o cultivo comercial, este artigo apresenta os recentes avanços no resfriamento e na criopreservação de gametas e embriões de interesse comercial.

Diluidores e crioprotetores

Na aplicação das técnicas de resfriamento e criopreservação, utilizam-se diluidores, que são soluções de sais ou de carboidratos as quais ajudam a manter as células viáveis durante o processo e têm por principais características a isotonia, a estabilidade, a esterilidade e o carreador de agentes crioprotetores (Legendre e Billard, 1980).

Em animais aquáticos, todas as moléculas crioprotetoras podem ser diluídas em água do mar (Gwo e Lin, 1998; Liu e Li, 2008; Tsai e Lin, 2009; Paredes et al., 2015) ou em água doce (Ferreira et al., 2015), ou frequentemente em meios diluidores com composições que podem variar de acordo com a espécie (Morales-Ueno et al., 2013).

O resfriamento e a criopreservação de gametas e embriões é uma alternativa viável, pois pode tornar a aquicultura independente do período reprodutivo natural, auxiliar nos processos de conservação das populações aquáticas, no transporte de embriões e nos programas de melhoramento genético (Ahammad et al., 2003).

Nimrat et al. (2005) utilizaram óleo mineral, solução de Ringer, tampão fosfato e cloridrato de sódio 0,85%, como diluente na preservação de espermátóforo de *Penaeus monodon*; entre estes, o óleo



mineral mostrou-se como o mais eficiente. Já para *Saccostrea glomerata*, Liu e Li (2008) utilizaram água do mar como diluente no preparo de soluções estoques de dimetilsulfóxido 10% e propilenoglicol 10% na criopreservação das larvas. A água do mar foi utilizada, também, como diluente por Tsai e Lin (2009) para criopreservação de embriões de *Stenopus hispidus* e por Paredes et al. (2015) para embriões de *Paracetrotus lividus*.

No geral, o congelamento e o descongelamento levam a um rearranjo da estrutura da membrana biológica, interferindo na funcionalidade das estruturas, seja do embrião, do oócito, seja do espermatozóide. A principal alteração ocorre na permeabilidade seletiva e na difusão lateral de proteínas na membrana. Outro fator que deve ser considerado é o tipo de agente crioprotetor (ACP), pois, além da permeabilidade, devem-se considerar os limites de tolerância osmótica e a condutividade hidráulica. Ainda, todos esses aspectos podem variar de acordo com a espécie utilizada (Fahy et al., 1987).

Quando se trata da reprodução de machos de invertebrados, existe uma grande diversidade na morfologia dos espermatozoides, relacionada às adaptações e às condições de fertilização, gerando, assim, diferentes formas de coleta e análise para estudos de toxicidade, resfriamento e criopreservação (Montanari, 2013).

Gwo e Lin (1998) analisaram diferentes ACP quanto à toxicidade, à capacidade relativa de proteção contra injúrias, bem como vários métodos de congelamento de embriões, náuplios e zoea de *P. japonicus*. Entre os ACP avaliados (glicerol, etilenoglicol - EG, polietileno glicol 300, álcool metílico - AM e dimetilsulfóxido - DMSO), o AM foi o mais efetivo contra os efeitos do resfriamento. Newton e Subramoniam (1996) utilizaram o EG e obtiveram sucesso na criopreservação dos embriões e das larvas de *P. indicus*. Bhavanishankar e Subramoniam (1997), ao trabalharem com espermatozoides de *Scylla serrata*, utilizaram AM, DMSO, EG e glicerol na criopreservação, em que AM mostrou-se o crioprotetor menos tóxico, porém não garantiu proteção efetiva contra as injúrias, pois o núcleo e a região acrossomal apresentaram danos proeminentes e perda da integridade morfológica.

Resfriamento e criopreservação

Na reprodução animal, as técnicas de resfriamento e de criopreservação são bastante utilizadas (Akarasanon et al., 2004; Nimrat et al., 2006; Kang et al., 2009; Yang et al., 2013), pois permitem a preservação de germoplasma paterno, materno e de linhagens reprodutivas ameaçadas de extinção. Servem também para facilitar o transporte de embriões e os programas de melhoramento genético (Diwan et al., 2010).

Os moluscos são organismos gonocóricos, com alguns casos de hermafroditismo em grupos diferentes, como em *Crassostrea*, que, embora apresente sexos separados, são hermafroditas sequenciais (Galtsoff, 1964). Nesses animais, a gônada masculina, quando madura, invade toda a cavidade do manto, e os gametas são liberados na cavidade do paleal. O espermatozóide é do tipo primitivo, com três partes distintas: cabeça, cauda e peça intermédia. Em *C. gigas* e *Mytilus galloprovincialis*, ocorrem variações morfológicas específicas, que estão relacionadas com as características dos oócitos a serem fertilizados. Em *C. gigas*, a cabeça do espermatozóide é arredondada, e entre o acrossomo e o núcleo se destaca a região subacrossômica, com componentes de actina fibrilar. O espermatozóide de *M. galloprovincialis*, por sua vez, é mais alargado, e o sistema fibrilar da região subacrossômica forma um canal intranuclear. O acrossomo é notável por seu comprimento (Bozzo et al., 2008).

O resfriamento de células cultivadas e obtidas de tecidos somáticos de bivalves e de gastrópodes, permite a preservação de 75-80% de células viáveis. Nesses animais, o crioprotetor de melhor resultado para tecidos somáticos foi o glicerol, embora a combinação de DMSO, glicerol e etilenoglicol (4% de cada) tenha sido relatada como eficiente para preservação de células vesiculares de *C. gigas* (Poncet et al., 2002; Hanquet-Dufour et al., 2006).

Paniagua-Chavez e Tierch (2001) testaram a melhor técnica de criopreservação de esperma e larva de *C. virginica*. As amostras de gônadas foram obtidas com tubo capilar e analisadas em microscópio, identificando-se o sexo com base na presença de ovos ou esperma. Após duas semanas de criopreservação, os melhores resultados foram o propilenoglicol a 10 ou 15%. Zell et al. (1979) obtiveram uma taxa de fertilização acima de 90%, usando espermatozoides pós-criopreservados por 68 dias em solução concentrada de Hank, contendo 8% de DMSO. Adams et al. (2004), para estabelecerem um protocolo comercial de produção de ova de *C. gigas*, coletaram o material gonático, analisaram em microscópio e determinaram o sexo por meio da utilização da trealose, conseguindo melhorar as taxas de fertilização para 80%.

Dentre os camarões destacam-se os estudos realizados com *M. rosenbergii* (Akarasanon et al., 2004), *Litopenaeus vannamei* (Nimrat et al., 2006), *L. schmitti* (Castelo-Branco, 2010; Bambozzi et al., 2014) e *P. monodon* (Nimrat et al., 2005; Vuthiphandchai et al., 2007). Além dessas espécies, estudos com caranguejo da espécie *S. serrata* (Guan et al., 2002) também vêm sendo realizados.

Dos ACP utilizados em espermatozoides de camarões, DMSO e o glicerol são os mais utilizados (Lezcano et al., 2004; Vuthiphandchai et al., 2007; Bambozzi et al., 2014). Em alguns casos, o glicerol foi indicado na concentração de 10% para preservação da massa espermática e de espermatozoides (Bambozzi et al., 2014).

Quanto à morfologia de espermatozóide de camarões, em trabalhos pioneiros realizados por meio de microscopia óptica, várias espécies foram analisadas: *P. japonicus* (Hudinaga, 1942), *P. indicus*



(Subrahmanyam, 1965) e *P. monodon* (Motoh, 1981). O espermatozoide é basicamente composto por uma cabeça e uma cauda curta, embora, para algumas espécies, como *P. astecus* (Clark et al., 1973) e *M. amazonicum* (Silva, 2006), a cabeça seja esférica e possua uma espícula imóvel que auxilia na fecundação.

Em fertilização *in vitro*, Clark et al. (1973) utilizaram gametas masculinos e femininos, obtidos por meio de dissecação, para produção de larvas de *P. aztecus*. Essa mesma técnica foi aplicada em *M. rosenbergii* e *M. acanthurus* (Sandifer e Smith, 1979). Já a técnica de eletroejaculação tornou-se mais difundida, sendo utilizada pela primeira vez em *M. rosenbergii* (Sandifer e Lynn, 1980). No entanto, o método mais usual, devido à sua simplicidade, é a extrusão manual (Nimrat et al., 2006; Vuthiphandchai et al., 2007; Nakayama et al., 2008)

Akarasanon et al. (2004) obtiveram espermátóforos de *M. rosenbergii* por meio de eletroejaculação e realizaram criopreservação, verificando que, para 10 dias a -20°C , pode-se utilizar o glicerol a 10 ou a 20% ou etilenoglicol a 20%. Mas, para criopreservação por 150 dias a -196°C , os autores recomendam etilenoglicol a 20%.

Salazar et al. (2008) destacaram que um dos principais problemas com a criopreservação de invertebrados é avaliar a integridade e sobrevivência espermática após o processo. Em peneídeos, o espermatozoide não possui motilidade, sendo um empecilho para a determinação da sobrevivência. Nimrat et al. (2008) citam que essa avaliação pode ser realizada por meio de microscopia óptica, métodos colorimétricos, avaliação da membrana espermática via SYBR 14/iodeto de propídeo e citometria de fluxo (Adams et al., 2003; Lezcano et al., 2004; Paniagua-Chávez et al., 2006).

Alvo de diversas pesquisas, a criopreservação de sêmen, a de ovos e a de embriões de ostras foram realizadas por Paniagua-Chavez et al. (1998), Choi e Chang (2003) e Suquet et al. (2014) com as espécies *C. virginica*, *Pinctada fucata martensii* e *C. gigas*, respectivamente. Destaca-se, ainda, a pesquisa realizada por Wang et al. (2011), na qual foram avaliados os efeitos de três crioprotetores, DMSO 5%, EG 10% e propilenoglicol 15%, combinados com trealose 0,2 M, na criopreservação de larvas de mexilhão *M. galloprovincialis*, cujas larvas foram cultivadas até 30h após fertilização a 21°C e criopreservadas, obtendo-se, por meio da utilização de DMSO 5%, uma taxa de sobrevivência larval de 55,3%. Embora avanços venham sendo alcançados, a aplicação das técnicas de criopreservação ainda é limitada para ovos de ostras.

A fase de desenvolvimento embrionário e o estágio larval têm influência no sucesso do resfriamento e da criopreservação. Tsai e Lin (2009), em trabalho de toxicidade com o camarão *Stenopus hispidus*, verificaram que o aumento da complexidade estrutural e a conseqüente diminuição da permeabilidade aos crioprotetores tornam o estágio embrionário de pré-eclosão mais tolerante à toxicidade do que os estádios de formação do olho e de batimento cardíaco. Já Liu e Li (2008) verificaram que, independentemente do uso de DMSO 10% ou propilenoglicol 10%, a sobrevivência de larvas de *S. glomerata* pós-criopreservação aumentou junto com o estágio larval nas primeiras 24h.

Congelamento e descongelamento

Diversos detalhes são importantes para o sucesso no armazenamento de gametas e embriões por longos períodos, pois para cada espécie utilizada existe variação na incorporação da solução crioprotetora adequada para eliminar as injúrias decorrentes do choque térmico e das velocidades de congelamento e descongelamento; o congelamento, ou ainda o descongelamento propriamente dito para finalmente ocorrer a utilização do material biológico (Carneiro, 2007). O fato de haver diversas etapas para o processamento de gametas ou de embriões para resfriamento ou criopreservação torna a aplicação dessas técnicas susceptível a pequenos erros, que podem acarretar a inviabilização do material biológico (Tiersch e Green, 2011).

A velocidade de congelamento e de descongelamento e os métodos de criopreservação têm grande influência sobre a sobrevivência do material biológico. Chow et al. (1985) testaram diferentes tempos de exposição (zero, cinco e 10 minutos), utilizando vapor de nitrogênio líquido para pré-congelamento de espermátóforos de *M. rosenbergii*. Essa etapa proporcionou sucesso na fertilização, diferentemente do grupo imerso diretamente no nitrogênio líquido.

Jeyalactumie e Subramoniam (1989), ao trabalharem com o caranguejo *Scylla serrata*, obtiveram resultados similares aos de Chow et al. (1985). Inicialmente as massas espermáticas foram mantidas em temperatura de equilíbrio, a 4°C , por 16h, e divididas em três grupos. Nos dois primeiros, o material foi exposto a vapor de nitrogênio líquido e a CO_2 gasoso por uma hora e acondicionado em nitrogênio líquido (-196°C) e em gelo seco (-79°C), respectivamente. No terceiro grupo, a manutenção foi realizada em freezer a -4°C . Após 30 dias, os melhores resultados de sobrevivência espermática foram observados no primeiro e no segundo grupo, os quais foram resfriados lentamente e, então, criopreservados.

Akarasanon et al. (2004) obtiveram melhores resultados para a sobrevivência espermática de *M. rosenbergii* utilizando a criopreservação lenta com resfriamento até -70°C , em uma velocidade de $1,5-2,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Os espermátóforos foram expostos ao vapor de nitrogênio líquido por dois minutos e, então, armazenados em botijão criogênico com nitrogênio líquido, alcançando a temperatura final de -196°C . Salazar et al. (2008) utilizaram um equipamento programável para congelamento de sêmen e de embriões durante o processo de criopreservação da massa espermática do camarão *L. vannamei*, em uma velocidade de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}$



min⁻¹ até a temperatura de -32°C para poder transferir o material biológico para o nitrogênio líquido na temperatura final de -196°C.

Conclusão

Existe necessidade de entendimento da ação de agentes crioprotetores sobre embriões, ovos, gametas ou larvas. O principal obstáculo para aplicação com sucesso dessas técnicas está na alta sensibilidade do material biológico, que depende do estabelecimento de um protocolo específico para cada espécie. Para espécies de invertebrados aquáticos, as tecnologias de resfriamento e de criopreservação são incipientes. As pesquisas podem se beneficiar desta revisão bibliográfica para adaptarem protocolos e, assim, avançarem e consolidarem a técnica para esses animais.

Referências

- Adams SL, Hessian, PA, Mladenov PV.** Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm. *Invertebr Reprod Dev*, v.44, p.45-51, 2003.
- Adams SL, Smith JF, Roberts RD, Janke AR, Kasparc HF, Tervit HR, Pugh PA, Webb SC, King NG.** Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production. *Aquaculture*, v.242, p.271-282, 2004.
- Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB.** Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2 degrees C° in diferente concentrations of metanol and sucrose. *Theryogenology*, v.60, p.1409-1422, 2003.
- Akarasanon K, Damrongphol P, Poolsanguan W.** Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res*, v.35, p.1415-1420, 2004.
- Bambozzi AF, Mattos LA, Mello MRB, Oshiro LMY.** Criopreservação do espermatóforo e da massa espermática do camarão branco *litopenaeus schmitti post mortem*. *Bol Inst Pesca*, v.40, p.49-60, 2014.
- Bhavanishankar S, Subramoniam T.** Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) *J Exp Zool*, v.277, p.326-336, 1997.
- Bozzo MG, Poquet M, Durfort ESM.** Ultraestructura dels espermatozóides de *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* i *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). *Treballs Soc Cat Biol*, v.59, p.59-70, 2008.
- Carneiro PCF.** Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.361-366, 2007.
- Castelo-Branco TC.** Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen do camarão-branco, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae). 2010. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- Choi YH, Chang, YJ.** The influence of cooling rate, developmental stage, and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*, v.46, p.190-193, 2003.
- Chow S, Tam Y, Ogasawara Y.** Cryopreservation of the spermatophore of the fresh water shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol Bull*, v.168, p.471-475, 1985.
- Clark WH, Talbot P, Neal RA, Mock CR, Salser BR.** In vitro fertilization with non motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Mar Biol*, v.22, p.253-254, 1973.
- Diwan AD, Ayyappan S, Lal KK, Lakra WS.** Cryopreservation of fish gametes and embryos. *Indian J Anim Sci*, v.80, p.109-124, 2010.
- Fahy GM, Levy DI, Ali SE.** Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*, v.24, p.196-213, 1987.
- Ferreira AVL, Castro EJT, Barbosa MAS, Sousa MLNS, Paiva MAN Soares Filho AA, Sampaio CMS.** Toxicity of cryoprotectants agents in freshwater prawn embryos of *Macrobrachium amazonicum*. *Zygote*, v.26, p.813.1-820, 2015.
- Galtsoff PS.** The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *US Fish Wildl Serv. Fish Bull*, v.64, p.1-480, 1964.
- Guan WB, Wang GZ, Li SJ, Chen GF.** [Cryopreservation of spermatozoa of mud crab (*Scylla serrata*) and viability assay]. *J Oceanogr Taiwan*, v.21, p.457-462, 2002.
- Gwo JC, Lin CH.** Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. *Therionogenology*, v.49, p.1289-1299, 1998.
- Hanquet-Dufour AC, Kellner K, Heude C, Naimi A, Mathieu M, Poncet JM.** Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity. *Cryobiology*, v.53, p.28-36, 2006.
- Hudinaga M.** Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* bate. *Japan J Zool*, v.10, p.305-393, 1942.
- Jeyalactumie C, Subramoniam T.** Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biol Bull*, v.177, p.247-253, 1989.
- Kang X, Li G, Mu S, Guo M, Ge S.** Acrosome reaction of chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*



- (Crustacea: Decapoda) spermatozoa: promoted by long-term cryopreservation. *Aquaculture*, v.295, p.195-199, 2009.
- Legendre M, Billard R.** Cryopreservation of Rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod Nutr Dev*, v.20, p.1859-1868, 1980.
- Lezcano M, Granja C, Salazar M.** The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology*, v.48, p.349-356, 2004.
- Liu B, Li X.** Preliminary studies on cryopreservation of sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) larvae. *J Shellfish Res*, v.27, p.1125-1128, 2008.
- Montanari T.** Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas [recurso eletrônico]. . Porto Alegre: Ed. do autor, 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodeembrio/>. Acessado em: 17 abr. 2015.
- Morales-Ueno K, Montaldo HH, Ortega AM, Paniagua Chavez CG, Castillo-Juarez H.** An extender solution for the short-term storage of *Litopenaeus vannamei* sperm to be used in artificial insemination. *Aquac Res*, v.44, p.1254-1258, 2013.
- Motoh H.** Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in the Philippines. Iloilo: SEAFDEC, Aquaculture Department, 1981. 128p.
- Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F.** Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci*, v.57, p.903-914, 2014.
- Nakayama C, Peixoto S, Lopes D, Vita G, Krummenauer D, Foes G, Cavalli R, Wasielesky W.** Métodos de extrusão de manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). *Cienc Rural*, v.38, p.2018-2022, 2008.
- Newton SS, Subramoniam T.** Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. *Cryobiology*, v.33, p.172-177, 1996.
- Nimrat S, Sangnawakij T, Vuthiphandchai V.** Preservation of Black Tiger shrimp *Penaeus monodon* spermatophores by chilled storage. *J World Aquacult Soc*, v.36, p.76-86, 2005.
- Nimrat S, Siriboonlamom S, Zhang S, Xu Y, Vuthiphandchai V.** Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. *Aquaculture*, v.261, p.944-951, 2006.
- Nimrat S, Suksawat S, Maleweach P, Vuthiphandchai V.** Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, v.285, p.123-129, 2008.
- Paniagua-Chavez CG, Buchanan JT, Tiersch TR.** Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. *J Shellfish Res*, v.17, p.231-237, 1998.
- Paniagua-Chavez CG, Jenkins J, Segovia M, Tiersch TR.** Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by the use of fluorescent dyes. *Cryobiology*, v.53, p.128-138, 2006.
- Paniagua-Chavez CG, Tiersch TR.** Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology*, v.43, p.211-223, 2001.
- Paredes E, Bellas J, Costas D.** Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing - Culture from cryopreserved embryos. *Aquaculture*, v.437, p.366-369, 2015.
- Poncet JM, Serpentine A, Boucaud-Camou E, Lebel JM.** Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliotis tuberculata* (Gastropoda) and postthawed primary cell cultures. *Cryobiology*, v.44, p.38-45, 2002.
- Salazar M, Lezcano M, Granja C.** Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (Ed.). *Methods in reproductive Aquaculture: marine and freshwater Species*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p.505-508.
- Sandifer PA, Lynn JW.** Artificial insemination of caridean shrimp. In: Clark Jr WH, Adams TS (Ed.). *Advances in invertebrate reproduction*. Amsterdam: Elsevier North Holland, 1980. p.271-288.
- Sandifer PA, Smith TIJ.** A method for artificial insemination of Macrobrachium prawns and it's potential use in inheritance and hybridization studies. *Proc World Mar Soc*, v.10, p.403-418, 1979.
- Silva GMF.** Estudo estrutural e ultraestrutural das gônadas masculinas dos diferentes morfotipos de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). 2006. 63p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2006.
- Subrahmanyam CB.** On the reproductive cycle of *Penaeus indicus* (M. Edw.). *J Mar Biol Assoc*, v.7, p.294-298, 1965.
- Suquet M, Labbe C, Puyo S, Mingant C, Quittet B, Boulais M, Queau I, Ratiskol D, Diss B, Haffray P.** Survival, growth and reproduction of cryopreserved larvae from a marine invertebrate, the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Plos One*, v.9:e93486, 2014.
- Tiersch TT, Green C.** Cryopreservation in aquatic species. 2 ed. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 2011. 1003p.
- Tsai S, Lin C.** Effects of cryoprotectant on the embryos of banded coral shrimp (*Stenopus hispidus*); preliminary studies to establish freezing protocols. *Cryo Lett*, v.30, p.373-381, 2009.
- Vuthiphandchai V, Nimrat S, Kotcharat S, Bart AN.** Development of a cryopreservation protocol for long term storage of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology*, v.68, p.1192-1199, 2007.



Wang H, Li X, Wang M, Clarke S, Gluis M, Zhang Z. Effects of larval cryopreservation on subsequent development of the blue mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Aquac Res*, v.42, p.1816-1823, 2011.

Yang H, Supan J, Guo X, Tiersch TR. Nonlethal Sperm Collection and Cryopreservation in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *J Shellfish Res*, v.32, p.429-437, 2013.

Zell SR, Bamford MH, Hidu H. Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster, *Crassostrea virginica* Gmein. *Cryobiology*, v.16, p.448-460, 1979.
