



## Dose inseminante e resfriamento de embriões de peixes de água doce

*Insemination dose and conservation of freshwater fish embryos*

Mayara Setúbal *Oliveira-Araújo*<sup>1</sup>, Carminda Sandra Brito *Salmito-Vanderley*<sup>1,2,3</sup>, Priscila Silva de *Almeida-Monteiro*<sup>1</sup>, Júlia *Trugilio Lopes*<sup>1</sup>, Liliane Vera *Leite-Castro*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [sandra.salmito@uece.br](mailto:sandra.salmito@uece.br)

### Resumo

A aquicultura tem sido utilizada como importante ferramenta para suprir o constante aumento do consumo de pescado. Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica quanto ambiental, é a utilização de técnicas de propagação artificial. Dessa forma, para otimizar a reprodução artificial têm-se investido em estudos afim de definir a proporção ideal de espermatozoides por ovócito e os melhores métodos de conservação para embriões de espécies de peixes de água doce. Objetivou-se fazer uma breve revisão sobre as doses inseminantes e a biotecnologia de resfriamento de embriões de peixes de água doce que já foram estabelecidas.

**Palavras-chave:** embriologia, espermatozoides/ovócito, reprodução, resfriamento, teleósteos.

### Abstract

*Aquaculture has been used as an important tool to meet the steady increase in fish consumption. A major aspect for the intensification of fish production, accompanied by both economic and environmental sustainability, is the use of techniques of artificial propagation. Thus, to optimize artificial reproduction have been invested in research in order to define the optimal ratio the sperm to oocyte and the best conservation methods for embryos species of freshwater fish. The objective was to make a brief review of the insemination doses cooling biotechnology freshwater fish embryos that have already been established.*

**Keywords:** *cooling, embryology, embryos sperm/oocyte, reproduction, teleost.*

### Introdução

O crescente aumento na demanda do pescado vem influenciando na busca de novas estratégias reprodutivas que otimizem a reprodução de espécies em cativeiro. Este acréscimo está intrinsecamente relacionado com a busca por alimentos mais saudáveis. No entanto, a busca para suprir o mercado consumidor levou a uma maior captura de pescado, acarretando na diminuição das populações naturais (FAO, 2014).

Desta forma, a aquicultura tem sido uma importante ferramenta para o aumento da produção em cativeiro (Hunter e Roberts, 2000). Além disso, ela tem auxiliado na reposição de espécies ameaçadas pela pesca extrativista. Responsável por 40% da produção mundial de pescado, a aquicultura tem se esforçado para ser, ao mesmo tempo, um setor mais produtivo e sustentável (FAO, 2014).

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental, é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Para tal, devem-se utilizar gametas de qualidade, promovendo máxima taxa de fertilização e subsequente desenvolvimento normal do embrião (Bobe e Labbe, 2010; Romagosa et al., 2010). Assim, visando a otimização do uso dos reprodutores na fertilização artificial, estudos têm sido realizados afim de definir a proporção ideal de espermatozoides e ovócitos, também denominada dose inseminante, que garanta uma máxima fertilidade, já que quando esta é definida corretamente há uma melhora significativa da taxa de fertilização (Leite, et al. 2013).

Além do conhecimento da dose inseminante ideal é necessário se conhecer a embriogênese das espécies cultivadas, para que dessa forma seja possível avaliar *in vivo* as consequências das aplicações de biotécnicas de conservação dos gametas ao ponto de interferir no desenvolvimento embrionário. Do mesmo modo, o estudo da embriogênese auxilia na identificação dos locais de desova em ambiente natural, na taxonomia e no conhecimento da biologia do desenvolvimento da espécie em questão (Nakatani et al., 2001).

Uma vez que a embriogênese de uma espécie é elucidada, novas perspectivas são abertas quanto ao desenvolvimento de biotécnicas que exijam manipulação dos embriões em fases iniciais do desenvolvimento. Dentre elas, podemos destacar o resfriamento de embriões, que vem sendo utilizado há algum tempo, com obtenção de bons resultados para espécies, como para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Lopes et al., 2012).

Diante disso, o presente trabalho objetivou fazer uma revisão sobre as doses inseminantes e a biotecnologia de resfriamento de embriões de peixes de água doce que já foram estabelecidas.

### Importância da dose inseminante na rotina de fertilização assistida

Na rotina de fertilização assistida têm-se buscado técnicas que visam o melhoramento da reprodução, ou seja, utilizar o menor número de reprodutores, sabidamente de genética superior, para obter um maior número de embriões por desova, e conseqüentemente de alevinos produzidos, de uma forma que não seja tão onerosa para o piscicultor. Em cativeiro, a técnica que vem sendo mais utilizada é chamada de fertilização a seco (Woynarovich-Horváth, 1983). Nela é minimizada a necessidade de uma duração longa da motilidade dos espermatozoides para encontrar a micrópila, abertura localizada no ovócito por onde o espermatozoide irá fertilizá-lo, uma vez que os gametas masculinos e femininos são inicialmente misturados, e só posteriormente é feita a adição da água para a ativação dos espermatozoides e hidratação dos ovócitos (Leite et al., 2013). Assim, a fertilização é otimizada pela aproximação prévia dos gametas (Carneiro, 2007).

Para que tais procedimentos sejam economicamente sustentáveis, deve-se otimizar a utilização dos gametas disponíveis, reduzindo o número de reprodutores e os gastos demandados para manutenção desses animais. Dessa forma, busca-se fertilizar o maior número de ovócitos com a menor quantidade de espermatozoides possível (Bombardelli et al. 2006). Isso se torna viável por meio da determinação da dose inseminante que garanta uma máxima fertilidade, produzindo assim mais embriões com maior economia de gametas.

Estudos relacionados ao número ideal de espermatozoides por ovócito, ou seja, da dose inseminante, já vem sendo realizados em várias espécies de teleosteos de água doce, como o jundiá (*Rhamdia quelen*; Bombardelli et al., 2006; Adames et al., 2015), o cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*; Baggio et al., 2007), a piabanha (*Brycon insignis*; Shimoda et al., 2007), o dourado (*Salminus brasiliensis*; Sanches et al., 2009), a piracanjuba (*Bryconorbignyanus*; Felizardo et al., 2010), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Sanches et al., 2011) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*; Leite et al., 2013). Os resultados das doses inseminantes e suas respectivas taxas de fertilização podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Razão ótima de espermatozoides (sptz) por ovócito e suas respectivas taxas de fertilização em algumas espécies de peixes de água doce.

Espécie	Razão ideal sptz/ovócito	Taxa de fertilização	Autores
<i>Rhamdia quelen</i>	89.497	86,68%	Bombardelli et al. (2006)
	90.000	60,65%	Adames et al. (2015) *
<i>Brycon insignis</i>	314.481 x 10 <sup>3</sup>	87,8%	Shimoda et al. (2007)
<i>Rhinelepis aspera</i>	1,2320 x 10 <sup>7</sup>	71,96%	Baggio et al. (2007)
<i>Salminus brasiliensis</i>	30.722	57,1%	Sanches et al. (2009)
<i>Bryconorbignyanus</i>	10,4 x 10 <sup>5</sup>	58,27%	Felizardo et al. (2010)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	105,481 e 210,963	~70%	Sanches et al. (2011)
<i>Colossoma macropomum</i>	100.000	84,2%	Leite et al. (2013)

\*Fertilização assistida utilizando sêmen criopreservado e frutose como solução ativadora.

Observa-se que cada espécie apresenta uma dose inseminante ideal que influencia diretamente nos valores das taxas de fertilização, demonstrando assim, que essas proporções são espécie-específicas. Essa variação deve-se também ao tamanho e à qualidade do ovócito, longevidade espermática e à distância percorrida pelos espermatozoides, que varia entre as espécies (Lahnsteiner, 2000). Segundo Suquet et al. (1995), quanto menor o diâmetro do ovócito, maior a probabilidade de os espermatozoides alcançarem a micrópila e fecundá-lo, uma vez que a distância a ser percorrida pelo espermatozoide influencia na capacidade fecundante. No entanto, para ovócitos de maiores diâmetros há a necessidade de uma maior quantidade de espermatozoides para a fecundação (Shimoda et al., 2007).

#### Influência do volume da solução ativadora sobre as taxas de fertilização

Outro fator que deve ser levado em consideração quando se trata da reprodução assistida de peixes, além da combinação adequada do número de espermatozoides por ovócitos, é o volume de solução a ser utilizado para ativação e hidratação dos gametas, uma vez que este pode afetar significativamente a taxa de fertilização (Souza, 2007). Em seu trabalho com *P. mesopotamicus*, Sanches et al., (2011) além de determinarem a dose inseminante, investigaram o efeito do volume de água (solução ativadora) sobre as taxas de fertilização. Esses autores testaram quatro volumes diferentes de água observaram que, mesmo com uma dose inseminante ideal, é necessário um volume adequado da solução ativadora, para se obter boas taxas de fertilização.

A diluição e a ativação dos gametas têm duas importantes implicações sobre as taxas de fertilização: o uso de pouca solução ativadora, além de comprometer a ativação espermática, pode proporcionar um meio inadequado para o encontro dos gametas (Chereguini et al., 1999); e o volume de água em excesso pode diluir

demasiadamente o meio, impedindo o espermatozoide de alcançar a micrópila durante o curto período de tempo de ativação que adquirem (Chereguini et al., 1999). Estes resultados já foram verificados por Sanches et al., (2009) em seu trabalho com *S. brasiliensis*. Neste sentido, alguns autores sugeriram que estas diluições não devem ser inferiores a 1:1000 (sêmen: solução ativadora), pois não garantem a eficiente diminuição da viscosidade seminal, afetando assim a completa ativação dos espermatozoides (Billard e Cosson, 1992).

Portanto, percebe-se que o conhecimento da dose inseminante e do volume da solução ativadora ideal utilizada no momento da fertilização, abre perspectivas para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas biotecnologias, apresentando grande importância para o desenvolvimento de programas de criopreservação de sêmen ou ovócitos, destinados tanto para fins de conservação da biodiversidade da espécie, quanto para o uso em programas de melhoramento genético em pisciculturas (Denniston et al., 2000). Além disso, possibilita a economia de gametas, já que o sêmen coletado de um único macho poderia fertilizar um número maior que apenas 1 a 5 fêmeas (Marques, 2001). Dessa forma, é possível limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva na rotina de reprodução artificial com sêmen fresco ou congelado, propiciando a exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e reduzindo os custos de produção (Fogli da Silveira et al., 1988).

### Resfriamento de embriões de peixes teleósteos de água doce

Definidos a dose inseminante e o volume da solução ativadora a ser utilizado no momento da fertilização, o próximo passo para a compreensão da biologia reprodutiva das diferentes espécies é o acompanhamento do desenvolvimento embrionário e a utilização desses conhecimentos no desenvolvimento de técnicas de conservação, como o resfriamento e a congelamento de embriões. Nos últimos 25 anos, atenção especial tem sido direcionada à criopreservação de ovócitos e embriões de peixes, mas os resultados ainda são contraditórios e desencorajadores (Zhang et al., 2007).

O insucesso na aplicação desta biotecnologia deve-se à alta sensibilidade da membrana ao frio, à formação de gelo intracelular durante o resfriamento lento, a elevada quantidade de vitelo e à grande complexidade da membrana de embriões de peixe (Rawson e Zhang, 2005). Para superar estes obstáculos é fundamental aprofundar o conhecimento sobre a toxicidade, a permeabilidade e a concentração de crioprotetores. Além disso, é importante sua associação a soluções nutritivas, bem como refinar os protocolos de resfriamento já existentes (Salmito-Vanderley et al., 2015).

Dentre os métodos de conservação de embriões pode-se destacar o resfriamento que consiste na preservação dos gametas e embriões viáveis sob temperaturas baixas, porém, acima do ponto de congelamento. Dessa forma, tem-se utilizado o resfriamento como alternativa, abrindo perspectivas que colaborem com a criopreservação. Os primeiros protocolos de resfriamento de embriões de peixes migradores foram descritos por Ahammad et al. (1998) para a carpa rohu (*Labeorohita*), a carpa indiana (*Catla catla*) e a carpa branca (*Cirrhinus mrigala*) e por Ahammad et al., (2002) para a carpa comum *Cyprinus carpio*.

Para as espécies de peixes nativas sul-americanas, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) já foi utilizado como modelo experimental para resfriamento de embriões. Streit Jr. et al., (2007) e Lopes et al., (2012) encontraram resultados de 64% de larvas vivas após o resfriamento de embriões desta espécie à -8 °C durante 6 horas. O protocolo de resfriamento depende, dentre outros fatores, da seleção dos embriões, da solução crioprotetora utilizada e do processo de resfriamento propriamente dito. Estes autores relataram que variações nestas etapas do protocolo podem interferir nas taxas de sobrevivência larval.

Inúmeros benefícios vêm sendo apontados a partir do domínio da técnica de resfriamento como, por exemplo, permitir a coleta de embriões em lugares remotos, mantê-los refrigerados durante o transporte até um local em que possam ser incubados com maior segurança (Hagedorn e Kleinhans, 2000), além de possibilitar a troca de material genético entre os planteis e conservação de material genético (Gorman, 2000). Do mesmo modo, esta tecnologia poderia fornecer embriões de diferentes espécies de peixes em determinadas estações do ano quando não há desova natural (Janik et al., 2000) e, conseqüentemente, permitir a otimização e o aumento da produção piscícola em cativeiro.

#### *Desenvolvimento embrionário e sensibilidade ao frio*

As segmentações de ovos do tipo telolécito, característica da maioria dos peixes teleósteos, ocorrem apenas no disco de citoplasma ativo do polo animal. O polo vegetal permanece indivisível durante todo o desenvolvimento embrionário, dando origem ao saco vitelínico, por isso, a segmentação é chamada parcial ou meroblástica discoidal (Kimmel et al., 1995). O desenvolvimento embrionário de algumas espécies de teleósteos já foi descrito e classificado em fases comuns neste grupo de peixes (Woynarovich e Horváth, 1983).

O estudo da ontogenia das espécies é uma importante ferramenta que pode ser utilizada como objeto de experimentação em processos biotecnológicos. Dessa forma, para o desenvolvimento de protocolos de resfriamento de embriões, deve-se conhecer aspectos fundamentais para o domínio da técnica, tais como a resistência a choques térmicos, a fase do desenvolvimento ontogenético em que os embriões permaneçam

íntegros e a sua toxicidade a crioprotetores (Zhang e Rawson, 1995).

A influência dos estágios embrionários já foi estudada por Ahammad et al. (2003) trabalhando com embriões de *Labeorohita*, no qual foi observado, por meio da estimativa das taxas de eclosão, que as melhores condições para estocagem dos embriões, em temperatura abaixo de zero, foram encontradas no estágio embrionário intermediário.

A sensibilidade ao frio está diretamente ligada à fase de desenvolvimento embrionário (Zhang e Rawson, 1995; Lopes et al., 2012). Lahnsteiner (2008) sugere que os estágios ontogenéticos iniciais são mais sensíveis à exposição ao crioprotetor do que estágios mais avançados. Para Zhang e Rawson (1995), essa sensibilidade nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário é maior devido à grande quantidade de lipídios no embrião, o que dificulta a ação dos crioprotetores. Assim, as fases mais desenvolvidas de embriões de peixes suportam melhor a toxicidade dos crioprotetores (Bart, 2000), já que durante as fases mais desenvolvidas a maior parte destes lipídios já foi consumida. Além disso, o início do processo de diferenciação celular pode ser afetado pelos crioprotetores e, pouco depois da fertilização, os processos que conduzem à proteção contra o ambiente ainda não estão completamente finalizados como o endurecimento do córion, absorção de água e osmorregulação (Zhang e Rawson, 1995).

Lopes et al., (2012), em seu trabalho com resfriamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), observaram que o melhor estágio do desenvolvimento embrionário para ser resfriado foi o de aparecimento da vesícula ótica. Assim, percebe-se que a toxicidade do crioprotetor está diretamente relacionada ao desenvolvimento do embrião, no geral, os embriões mais jovens, menos desenvolvidos, apresentam-se menos tolerantes ao crioprotetor (Miliorini, 2012). Mesmo assim, é importante ressaltar que o organismo se encontrando em uma fase mais complexa, as células encontram-se em processo de grande diferenciação celular e organogênese, momento estes em que estas estão mais propensas a sofrer teratogênese. Portanto, segundo Salmito-Vanderley et al., (2015), na escolha do crioprotetor deve-se levar em consideração seu grau de toxicidade.

Outro fator importante num protocolo de resfriamento é a curva de resfriamento, o que nada mais é do que a velocidade de redução da temperatura concomitantemente com a desidratação que as células sofrem enquanto estão sendo resfriadas devido a presença dos crioprotetores (Lopes et al., 2012). Ainda segundo estes autores, quando o resfriamento é lento o suficiente as células são capazes de perder água rapidamente por osmose, e assim suportar a desidratação. Por outro lado, se o resfriamento for rápido demais, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido do que o da água intracelular, resultando em água intracelular remanescente que pode formar gelo intracelular letal para as células (Zhang et al., 2007).

#### *Crioprotetores utilizados em embriões de peixes*

Para que as células sejam mantidas em baixas temperaturas é essencial a utilização de agentes crioprotetores, pois, na sua ausência ocorre a formação de cristais de gelo, considerados letais para as células (Polge et al., 1949; Leibo, 2000). Por outro lado, apesar de necessário, a sua toxicidade pode provocar a mortalidade das células durante a entrada ou saída no seu interior (Chao e Liao, 2001).

Dentre os crioprotetores utilizados para embriões de peixes destacam-se o metanol e o dimetilsulfóxido (DMSO), como crioprotetores intracelulares; e a sacarose, como crioprotetor extracelular (Niemann, 1991).

Um protocolo de resfriamento para as espécies de peixes nativos sul-americanos foi sugerido por Streit Jr. et al. (2007) para embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), utilizando combinações de crioprotetores extra (17,1% de sacarose) e intracelulares (9% de metanol), para o resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$ , estocados por seis horas, recomendando a utilização de tal solução para a realização deste protocolo. Até meados de 1995, a maioria dos estudos apontavam o DMSO como o melhor crioprotetor para congelamento (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 o pacu (*P. mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*; Fornari et al., 2012; Nascimento et al., 2014).

Logo, para o sucesso na conservação de embriões devem-se conhecer as características morfofisiológicas dos mesmos assim como a sua cronologia de desenvolvimento e como se dá sua interação com os meios de criopreservação. Além disso, segundo Salmito-Vanderley et al., (2015) deve-se pesquisar se os embriões de determinada espécie suportam a redução de temperaturas (direta ou indireta); qual a curva ideal de para o resfriamento; qual a fase do desenvolvimento embrionário é mais propícia fazê-lo; e também a toxicidade provocada pela interação de diluente/crioprotetor, este sendo fator fundamental para o domínio da técnica.

#### **Considerações finais**

Estudos relacionados à definição da dose inseminante ideal têm sido realizados para diversas espécies de peixes de água doce. No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas que definam esta proporção para as demais espécies e que avaliem a influência do volume da solução ativadora sobre as taxas de fertilização. Nota-se ainda, que os protocolos destinados ao resfriamento de embriões de peixes teleósteos ainda não estão bem



definidos, sendo necessária a realização de amplos estudos para a eficiência do emprego de biotecnologias decriopreservação (resfriamento e congelamento) de embriões.

### 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.
- Adames MS, Toledo CPR, Neumann G, Buzzi AH, Buratto CN, Piana PA, Bombardelli RA.** Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *AnimReprodSci*, v.161, p.119-128, 2015.
- Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB.** Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeorohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology*, v.46, p.1-16, 2003.
- Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB.** The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology*, v.44, p.114-121, 2002.
- Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB.** Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeorohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. *Cryobiology*, v.37, p.318-324, 1998.
- Bart A.** New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: Tiersch, TR, Mazik PM. *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p.179-187, 2000.
- Baggio DM, Sanches EA, Sykora RM, Bombardelli RA, Souza BE, Vidal E.** Relação espermatozoide:ovócito na fertilização de ovócitos do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). In: Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, Embrapa, Dourados. Anais... Dourados: CBPPNAD, 2007. Resumo.
- Billard R, Cosson MP.** Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool*, v.261, p.22-31, 1992.
- Bobe J, Labbe C.** Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocr*, v.165, p.535-548, 2010.
- Bombardelli RA, Morschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA, Syperreck MA.** Insemination dose for artificial fertilization of grey jundiá oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). *Rev Bras Zootec*, v.35, p.1251-1257, 2006.
- Carneiro PCF.** Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixe. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, n.3, p.361-366, 2007.
- Chao NH, Liao IC.** Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, v.197, p.161-189, 2001.
- Chereguini O, De La Banda IG, Rasines I, Fernandez A.** Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. *Aquac Res*, v.30, p.319-324, 1999.
- Denniston RS, Michelet S, Godke RA.** Principles of Cryopreservation. In: Tiersch TR, Mazik PM. *Cryopreservation in aquatic species*. Morgantown. The World Aquaculture Society, p.59-74, 2000.
- Felizardo VO, Murgas LDS, Drumond MM, Silva JA.** Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Bryconorbignyanus*). *Rev Ceres*, v.57, p.648-652, 2010.
- Fogli da Silveira W, Kavamoto ET, Rigolino MG, Tabata YAO.** Fertility rainbow trout semen, *Salmo irideus* gibbons in different concentrations of sperm per egg. *Bol Instit Pesca*, v.15, p.51-54, 1988.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations- FAO.** 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. 243p.
- 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.
- Gorman OT.** Ecological and genetic considerations for collection of gametes from wild fishes. In: Tiersch TR, Mazik PM. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p.139, 2000.
- Hagedorn M, Kleinhans FW.** Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: Tiersch TR, Mazik PM. *Cryopreservation in aquatic species*, Baton Rouge: World Aquaculture Society, p.161-178, 2000.
- Hunter BJ, Roberts DCK.** Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutr Res*, Amsterdam, v. 20, p. 1047-1058, 2000.
- Janik M, Kleinhaus FW, Hagedorn M.** Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachidanioreio*). *Cryobiology*, v.41, p.25-34, 2000.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF.** Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dynam*, v.203, p.255-310, 1995.
- Lahnsteiner F.** Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. *Aquac Res*, v.31, p.245-258, 2000.
- Lahnsteiner F.** The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, v.69, p.384-396, 2008.



- 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 Zoo*, v. 65, p. 421-429, 2013.
- Leibo SP.** Sources of variation in cryopreservation. In: Tiersch TR, Mazik PM. Cryopreservation in aquatic species, Baton Rouge: World Aquaculture Society, p.75-83, 2000.
- Lopes T, Streit Jr. DP, Fornari DC, Oliveira D, Ribeiro RP, Romagosa E.** Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. *Zygote*, v.21, p.1-6, 2012.
- Marques S.** Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce. 2001. 98f. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- Miliorini AB.** Resfriamento e congelamento de embriões de dourado (*Salminus brasiliensis*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piapara (*Leporinus obtusidens*). 2012. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2012.
- Nakatani HK, Agostinho AA, Baumgartner G, Bialezki A, Sanches PV, Makrakis MCM, Pavanelli, CS.** Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá. EDUEM, p.378, 2001.
- 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.
- Niemann H.** Cryopreservation of ova and embryos from livestock current status and research needs. *Theriogenology*, v.35, p.109-124, 1991.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- Rawson D, Zhang T.** New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. The role of biotechnology- Villa Gualino, Turin, Italy, p.209-210, 2005.
- Romagosa E.** Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: Cyrino JEP, Urbinati EC. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura. AQUABIO, Jaboticabal. p.108-116, 2006.
- Romagosa E, Souza BE, Sanches EA, Baggio DM, Bombardelli RA.** Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *J Appl Ichthyol*, v.26, p.678-681, 2010.
- Salmito-Vanderley CSB, Lopes JT, Torres TM, Pereira VA, Leite-Castro LV.** Conservação de gametas e embriões de peixes teleosteos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.184-188, 2015.
- Sanches EA, Baggio DM, Piana PA, Souza BE, Bombardelli RA.** Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *Rev Bras Zootec*, v.40, p.1-6, 2011.
- Sanches EA, Bombardelli RA, Baggio DM, Souza BE.** Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Rev Bras Zootec*, v.38, p.2091-2098, 2009.
- Shimoda E, Andrade DR, Vidal MV, Godinho HP, Yasui GS.** Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the piabanha *Brycon insignis*. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.59, p.877-882, 2007.
- Souza BE.** Fertilização artificial de curimatá *Prochilodus lineatus*. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2007
- 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.
- Suquet M, Billard R, Cosson J, Normant Y, Fauvel C.** Artificial insemination in turbo (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture*, v.133, p.83-90, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M.** Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydaniorerio*) embryos. *Cryobiology*, v.32, p.239-246, 1995.
- Zhang T, Rawson DM, Pekarsky I, Blais J, Lubzens E.** Low temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: Badin PJ, Cerdà, J, Lubzens E, The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications, Springer, P.411-436, 2007.
- Woyanovich E, Horváth L.** A propagação artificial de peixes de águas tropicais. Brasília FAO/ CODEVASF/CNPq. 220 pp. 1983.
-