



Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelação e uso de antioxidantes

Semen conservation technology fish: cooling, freezing and use of antioxidants

Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley¹, Priscila Silva de Almeida-Monteiro, R.V. Nascimento

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

¹Correspondênciasandra.salmito@uece.br

Resumo

Esta revisão tem o intuito de abordar as principais biotécnicas reprodutivas aplicadas à conservação seminal de peixes teleósteos, destacando-se o resfriamento (conservação a curto prazo) e a congelação (conservação a longo prazo). Apesar dos inúmeros benefícios, como a conservação de espécies, sabe-se que essas técnicas podem ocasionar danos às células espermáticas. Dessa forma, a fim de manter a viabilidade celular durante o resfriamento e após a descongelação, utiliza-se soluções diluidoras adequadas e busca-se suplementá-las para obter melhores resultados. Portanto, o aprimoramento dessas técnicas torna-se de grande relevância para o desenvolvimento da piscicultura.

Palavras-chave: ictiofauna, caraciformes, resfriamento, criopreservação.

Abstract

This review aims to address key reproductive biotechnologies applied to the seminal conservation teleost fish, cooling highlighting (short term storage) and freezing (long term storage). Despite the many benefits, such as species conservation, it is known that these techniques can cause damage to sperm cells. Thus, in order to maintain cell viability during cooling and after thawing, use is made appropriate diluting solutions and seeks to supplement them for best results. Therefore, the improvement of these techniques becomes of great importance for the development of fish farming.

Keywords: *ichthyofauna, characiformes, cooling, cryopreservation.*

Introdução

A conservação seminal de peixes tem como função preservar os gametas masculinos para a utilização em fertilização assistida. Por isso, o desenvolvimento de técnicas aplicadas à reprodução vem assumindo papel relevante na aquicultura e na conservação de recursos genéticos (Murgas et al., 2004). Além disso, a conservação seminal procura resolver problemas tanto de ordem econômica, como atender ao mercado consumidor, quanto de ordem ecológica, visando a não extinção de espécies de peixes super-exploradas (Maria, 2005).

Dentre as técnicas de conservação seminal destacam-se o resfriamento e a congelação de gametas, sendo essas biotécnicas reprodutivas importantes ferramentas na obtenção de um manejo mais fácil dos reprodutores, pois dispensa a presença do macho no momento da fertilização, eliminando, assim, o problema de assincronia da atividade reprodutiva; reduz o número de reprodutores machos mantidos na estação de piscicultura; promove a troca de material genético entre fazendas produtoras de pescado, facilitando o estabelecimento de programas de melhoramento genético; e auxilia nos programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção (Isaú, 2006; Godinho, 2007).

As técnicas de resfriamento e congelação utilizam soluções diluidoras, que tem como função diminuir o metabolismo espermático. Para o resfriamento seminal, o diluente irá diminuir a concorrência dos espermatozoides por oxigênio e espaço, além de ajudar a controlar o crescimento bacteriano no sêmen (Carolsfeld e Harvey, 1999). Em relação à congelação, a presença da solução diluidora é imprescindível, assim como o uso de crioprotetores de ação interna e/ou externa, pois muitos danos são ocasionados pela ação do frio durante esse processo (Salmito-Vanderley et al., 2014).

Diante disso, têm-se buscado suplementar os meios diluentes com substâncias que minimizem ao máximo os danos que podem ser causados durante os processos de conservação de sêmen. O uso de substâncias antioxidantes pode manter as células espermáticas viáveis durante e após esses processos, permitindo uma boa qualidade seminal e, conseqüentemente, boas taxas de fertilização.

Conservação seminal a curto prazo: Resfriamento

O resfriamento seminal é uma técnica de preservação de sêmen a curto prazo que consiste na



manutenção da viabilidade das células espermática por um período de horas ou dias, usualmente em temperaturas de refrigeração, sendo indicada para facilitar o manejo, por dispensar a presença do macho no ato da fecundação, além de aumentar a eficiência da reprodução assistida nas estações de piscicultura (Murgas et al., 2004).

Stoss e Donald (1982) relatam que os fatores que determinam o sucesso da técnica de resfriamento é a redução da temperatura, o fornecimento e a troca de gases com o meio e a prevenção do desenvolvimento bacteriano e da dessecação. Contudo, avaliações devem ser realizadas nos diluentes e nas condições de estocagem, pois esses fatores, associados ao tempo de armazenamento, podem interferir na qualidade seminal, uma vez que condições anaeróbias unidas à contaminação microbiana diminuem a motilidade e a viabilidade espermática (Rurangwa et al., 2004).

No resfriamento de sêmen não diluído, alguns fatores podem fazer com que a motilidade chegue a 0% em pouco tempo, como o envelhecimento celular, a competição por espaço e oxigênio e o crescimento bacteriano (Viveiros et al., 2014). Contudo, poucos trabalhos sobre resfriamento seminal envolvem o uso de diluidores, como os estudos de Viveiros et al. (2014; *P. lineatus*) e de Oliveira (2012; *Colossoma macropomum*), que utilizaram a água de coco em pó específica para peixes (ACP-104). Nestes trabalhos, o sêmen de *P. lineatus* e de *C. macropomum*, após dois dias de resfriamento, apresentou taxas de motilidade de 20% e 31% respectivamente, mostrando, assim, que o ACP é um eficiente diluente para o resfriamento do sêmen das referidas espécies.

Durante o processo de resfriamento seminal, normalmente, não há adição de crioprotetor. Trabalhos que avaliaram o efeito de alguns crioprotetores sobre a motilidade espermática, durante o tempo de resfriamento, não encontraram vantagens no acréscimo de um crioprotetor interno para a preservação do sêmen a 4°C (Maria, 2005). Porém, outros autores observaram melhorias na viabilidade espermática por um período de dias mais prolongados quando foi adicionado crioprotetor ao diluente (Murgas et al., 2002).

Conservação seminal a longo prazo: Criopreservação

A criopreservação do sêmen consiste na conservação, a longo prazo, dos gametas por meio de congelamento em nitrogênio líquido.

O sêmen congelado pode ser mantido em bancos de sêmen por prazo indeterminado, o que possibilita o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados, eliminação do problema de assincronia da atividade reprodutiva entre machos e fêmeas, redução do número de reprodutores machos mantidos na estação de piscicultura, com conseqüente redução dos custos (Godinho, 2007).

A técnica de congelamento celular pode ser dividida em três etapas: (1) As células são submetidas a uma solução crioprotetora, que, devido à diferença de concentração, desidrata a célula, reduzindo a quantidade de água intracelular, o que evita a formação de cristais de gelo que podem danificar a membrana citoplasmática. (2) Posteriormente, a célula deve regular a osmolaridade, ficando isotônica com o meio extracelular, o que pode causar efeitos tóxicos e impacto osmótico nas mesmas. (3) Finalmente, diminui-se a temperatura passando pelo ponto de congelação da água e da solução crioprotetora (Lezcano, 2001).

Existem vários utensílios e equipamentos para congelar as amostras de sêmen, sendo os mais utilizados as geladeiras de isopor, *dry shippers*, *freezers* reguláveis e botijões criogênicos, dentro dos quais são introduzidas palhetas francesas plásticas de 0,25 ou 0,5 mL ou criotubos de 1,2 a 5,0 mL (Maisse et al., 1998).

Meios de congelação: diluentes e crioprotetores

Para a congelação é necessário que o sêmen seja diluído em um meio composto pelo diluente e pelo crioprotetor. O meio de congelação é responsável por nutrir a célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelação e descongelação seminal. Salmito-Vanderley et al. (2012) lista vários meios de congelação utilizados na criopreservação do sêmen de algumas espécies da ordem Characiformes.

O diluente, geralmente uma solução rica em sais e/ou carboidratos, promove o aumento do volume de sêmen, facilitando sua distribuição em doses, e atua como fonte de energia para o espermatozoide pós-descongelado. As condições mínimas requeridas para um diluente adequado são: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estabilidade, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozoides; esterilidade, para não vincular microrganismos nocivos às células espermáticas; e, finalmente, servir como carreador de crioprotetores (Legendre e Billard, 1980).

A glicose 5% destaca-se nesse contexto por tratar-se de uma solução de fácil aquisição, já testada com sucesso para várias espécies de peixes, como *P. lineatus* (Nascimento et al., 2010), *P. brevis* (Nunes et al., 2016) e *C. macropomum* (Oliveira et al., 2016). Outras substâncias utilizadas com sucesso como diluentes de sêmen de peixe foram: BTS – Beltsville Thawing Solution® (Oliveira et al., 2016), água de coco *in natura* (Farias et al., 1999) e água de coco em pó – ACP-104 (Leite et al., 2011), entre outras.

O crioprotetor, por sua vez, tem como função proteger as células espermáticas dos efeitos deletérios



provocados pela criopreservação. Devem possuir baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (Batista et al., 2006).

Tais crioprotetores podem ser classificados como intracelulares ou de ação interna e extracelulares ou de ação externa. Os crioprotetores de ação interna, como dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etilenoglicol, e metilglicol, usados geralmente a uma concentração de 10%, são indispensáveis para o sucesso da criopreservação, pois atuam desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior da célula, dificultando a formação de cristais de gelo intracelulares. Os crioprotetores de ação externa, como a gema de ovo e a sacarose, podem ser ou não adicionados ao meio de congelação e auxiliam na proteção celular recobrando a superfície da célula e estabilizando a membrana (Watson, 1995; Maria, 2005).

Apesar de imprescindível para o processo de criopreservação, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos e podem reduzir a capacidade fertilizante do espermatozoide devido à lesão por danos osmóticos (Graham, 1996)

Na maioria dos trabalhos, observa-se que 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.

Apesar dos benefícios, a criopreservação pode causar alterações ultraestruturais no espermatozoide, devido a diversos fatores, tais como as modificações na osmolaridade do meio (Marques, 2001) e a peroxidação lipídica, que consiste na degradação oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidios da membrana plasmática por ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), modificando a estrutura e a permeabilidade dessas membranas (Mello-Filho et al., 1984). Assim, faz-se necessário a suplementação dos meios de congelação com substâncias adequadas, que promovam a máxima proteção à célula espermática.

Suplementação dos meios de congelação com Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que regulam, removem e suprimem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou contrariam suas ações (Sikka, 2004; Maneesh e Jayalekshmi, 2006), evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação (Degáspari e Waszczyński, 2004). As EROs são continuamente produzidas pelo metabolismo aeróbio celular e seu excesso pode levar a célula ao estresse oxidativo, que promove várias alterações patológicas, incluindo lesões na membrana plasmática e no DNA (Słowińska et al., 2013).

O mecanismo de defesa antioxidante é dividido em três etapas: Prevenção, na qual ocorre a inibição da produção de EROs; Intercepção, que interrompe a reação em cadeia da oxidação, impedindo a atuação das EROs; e Reparação, na qual os danos causados pelas EROs são corrigidos. Esta última etapa não é observada nos espermatozoides em virtude da carência de citoplasma, fonte rica de enzimas antioxidantes (Saleh e Agarwal, 2002), pois, durante o período de maturação, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma, sendo privados de boa parte dos antioxidantes endógenos (Carvalho et al., 2002). Além disso, a membrana plasmática dos espermatozoides é rica em ácidos graxos poliinsaturados, que são mais vulneráveis aos ataques das EROs (Wathes et al., 2007), fazendo com que essas células sejam mais facilmente submetidas ao estresse oxidativo.

No sêmen estão presentes antioxidantes intra e extracelulares que constituem os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (Sanocka e Kurpisz, 2004; Silva et al., 2011). Antioxidantes enzimáticos são macromoléculas oriundas ou não do próprio organismo, que protegem o mesmo contra as EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), podendo atuar diretamente sobre estes agentes ou reparar os danos por eles causados no organismo (Barreiros et al., 2006). Dentre os antioxidantes desse tipo presentes no sêmen, pode-se citar a superóxido dismutase, a catalase e o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase (Carvalho et al., 2002; Alvarez e Moraes, 2006). Antioxidantes não enzimáticos são micromoléculas oriundas ou não do próprio organismo que têm por função protegê-lo das ações deletérias das EROs e ERNs (Barreiros et al., 2006). Como exemplos desta categoria de antioxidantes, tem-se α -tocoferol, ácido ascórbico, urato, piruvato, glutatona, taurina e hipotaurina. Tanto os enzimáticos quanto os não-enzimáticos reduzem as concentrações dos agentes oxidantes no sêmen a níveis fisiológicos e mantêm a fertilidade natural e assistida mais adequada (Agarwal e Saleh, 2002; Saleh e Agarwal, 2002).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais enzimas antioxidantes presentes nas células eucarióticas, encontrada principalmente no citosol e nas mitocôndrias. Sua ação consiste em catalisar a dismutação do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Ferreira e Matsubara, 1997).

A catalase (CAT), encontrada nos peroxissomas e nas mitocôndrias, atua de forma complementar à SOD, uma vez que converte o H_2O_2 , em H_2O e O_2 , produtos estes que são utilizados para a respiração celular (Maneesh e Jayalekshmi, 2006).

A glutatona peroxidase e a glutatona redutase formam um sistema, agindo em conjunto contra a peroxidação lipídica, inibindo as EROs e, conseqüentemente, mantendo a motilidade espermática (Maneesh e Jayalekshmi, 2006; Sikka, 2004). A glutatona peroxidase atua como catalisador da reação de degradação do H_2O_2 e de outros peróxidos orgânicos (Ferreira e Matsubara, 1997; Alvarez e Moraes, 2006). A glutatona redutase, por sua vez, reduz a glutatona peroxidase que foi oxidada para que esta tenha sua ação restaurada e



possa agir contra as EROs (Silva e Guerra, 2012).

A vitamina C (ácido ascórbico) é comumente encontrada no organismo na forma de ascorbato, constituindo um antioxidante de notável atuação *in vivo*, uma vez que neutraliza as EROs e ERNs por meio de reações de redução, com concomitante inibição da peroxidação lipídica (Barreiros et al., 2006). A inibição da peroxidação lipídica promovida pela vitamina C ocorre de forma direta ou indireta sobre as membranas celulares em meios aquosos e isto se deve ao fato deste antioxidante atuar eficientemente sobre EROs como O_2^{2-} , H_2O_2 , hipoclorito (ClO^-), OH^- e radical peroxil (OOH^*) (Vasconcelos et al., 2007).

A vitamina E (α -tocoferol) é um antioxidante não enzimático (Maneesh e Jayalekshmi, 2006), lipossolúvel, natural da membrana plasmática e que pode proteger os espermatozoides contra danos oxidativos no DNA e na própria membrana (Sikka, 2004). O efeito protetor deste antioxidante decorre de sua capacidade em prevenir a peroxidação lipídica e suprimir, por conseguinte, a produção de malondialdeído, um dos maiores indicadores de estresse oxidativo (Aitken e Clarkson, 1988), o que é possível pelo fato de atuar como quelante das EROs produzidas durante a lipoperoxidação (Ferreira e Matsubara, 1997).

Com a perda de parte dos antioxidantes endógenos, devido aos processos inerentes à gametogênese, os espermatozoides maduros passam a depender, basicamente, da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal (Carvalho et al., 2002; Alvarez e Moraes, 2006), que se torna a mais importante forma de proteção utilizada por estas células no combate às EROs (Sikka, 2004). Contudo, o processo de criopreservação do sêmen favorece o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos agentes oxidativos, com comprometimento da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides, tanto pela marcante redução de suas concentrações após a diluição do sêmen, quanto pelo estímulo à produção de EROs durante a criopreservação (Guerra et al., 2004; Sarlós et al., 2002; Watson, 2000). Esse desequilíbrio resulta em efeitos tóxicos e comprometimento da funcionalidade celular, o que conduz à apoptose e redução da fertilidade dos espermatozoides (Purdy, 2006; Stornelli et al., 2005; Turrens, 2003).

A fim de melhorar a qualidade do sêmen criopreservado, por meio da prevenção ou redução do processo peroxidativo, diversos pesquisadores têm realizado estudos relacionados à adição de antioxidantes nos diluidores seminais de diversas espécies de peixes (Cabrita et al., 2011; Ubilla e Valdebenito, 2011; Martínez-Páramo et al., 2012; Navarro et al., 2014; Liu et al., 2015), obtendo-se resultados satisfatórios.

Contudo, as diferentes substâncias antioxidantes podem ter ação espécie-específica. Askari et al. (1994) e Pena et al. (2003), trabalhando com sêmen humano e de javali, respectivamente, encontraram boas taxas de motilidade espermática quando adicionaram vitamina E aos meios de congelamento. Diferentemente, Cabrita et al. (2011) e Navarro et al. (2014) não obtiveram bons resultados para este parâmetro quando adicionaram este mesmo antioxidante aos meios de diluição seminal de *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* e de *P. lineatus*, respectivamente.

Outro fator importante é a concentração do antioxidante utilizado. Sabe-se que as EROs são fundamentais para alguns processos fisiológicos nos espermatozoides de mamíferos, tais como a hiperativação, a capacitação e a reação acrossômica. Dessa forma, o uso de substâncias antioxidantes nos meios de diluição seminal pode apresentar efeitos indesejáveis se a dose de segurança for ultrapassada, pois podem inibir essas funções (Carvalho et al., 2002). Contudo, ainda não se sabe qual o papel das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides de peixes que realizam fecundação externa.

Considerações Finais

O processo de conservação de sêmen permite a reprodução em cativeiro de espécies de peixes reofílicas e ameaçadas, além de reduzir os custos com reprodutores para os piscicultores. Tais técnicas encontram-se bem desenvolvidas, contudo, ainda é necessário aperfeiçoar as soluções diluidoras. A suplementação dos meios de conservação com substâncias antioxidantes tem-se mostrado promissora, sendo necessários mais estudos para o desenvolvimento de diluentes apropriados para cada espécie, a fim de se obter uma máxima qualidade espermática e, conseqüentemente, boas taxas de fertilização.

Agradecimentos

Ao Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal.

Referências

- Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin N Am*, v.29, n.4, p.817-827, 2002.
- Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*, v.9, n.6, p.367-376, 1988.
- Alvarez CA, Moraes GV. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Rev Saú e Biol*, v.1, n.1,



p.42-51, 2006.

Askari HÁ, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch of Androl*, v.33, n.1, p.11-15, 1994.

Barreiros ALBS, David JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím N*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

Batista M, Alamo D, Gonzalez F, Cruz MG, Gracia A. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultra freezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod Domest Anim*, v.41, n.5, p.423-428, 2006.

Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim Reprod Sci*, v.125, n.1, p.189-195, 2011.

CAROLSFELD, D. J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: Worl Fische Trust. Curso de treinamento brasileiro. 47 p, 1999.

Carvalho OF, Ferreira JDJ, Silveira NA, Freneau GE. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *J Bras de Pat e Med Lab*, v.38, n.1, p.33-38, 2002

Degáspari CH, Waszczyński N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *V Acad*, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

Farias JO, Nunes JF, Carvalho MAM, Sagueiro CCM. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Rev Cien Prod Ani*, v.1, n.1, p.44-58, 1999.

Ferreira ALA, Matsubara JS. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Méd Bras*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

Godinho HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

Graham, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin N Ame: Equi Pract*, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

Guerra MMP, Evans G, Maxwell WHC. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.28, p.187-195, 2004.

Isaú ZA. População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de semen de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) submetido ao resfriamento. 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

Legendre M, Billard R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod Nutr Dev*, v.20, n.6, p.1859-1868, 1980.

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, n. 2, 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. 115p. Monografía (Graduação em Biologia Marinha) - Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 2001.

Liu Q, Wang X, Wang W, Zhang X, Xu S, Ma D, Xiao Z, Xiao Y, Li J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pargus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol Biochem*, v.41, n.2, p.413-422, 2015.

Maisse G, Labbe C, Ogier de Baulny B, Leveroni S, Haffray P. Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA Prod Anim*, v.11, n.1, p.57-65, 1998.

Manceesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Ind J Clin Bioche*, v.21, n.2, p.80-89, 2006.

Maria AN. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

Marques S. Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce. 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, MG, 2001.

Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Herráez MP, Sarasquete C, Cabrita E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidante system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, v.77, n.6, p.1129-1136, 2012.

Mello-Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemical Journal*, v.218, n.1, p.273-275, 1984.

Murgas LDS, Miliorini AB, Silva MOB, Franciscatto RT, Maria AN. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriado do sêmen a 4°C. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, n.3, p.211-213, 2002.

Murgas LDS, Miliorini AB, Franciscatto RT, Maria AN. Viabilidade espermática do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *Rev Bras Zootec*, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.



- Nascimento AF, Maria NA, Pessoa NO, Carvalho MAM, Viveiros ATM.** Out-of-season sperm cryopreservation in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim Reprod Sci*, v.118, n.2, p.324-329, 2010.
- Navarro RD, Navarro FKSP, Felizardo VO, Murgas LDS, Andrade SS.** Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. *Acta Scientiarum*, v.36, n.1, p.55-60, 2014.
- Nunes LT, Oliveira MS, Lopes JT, Souza MEM, Pinheiro RRR, Campello CC, Salmito-Vanderley CSB.** Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. *Semina Ciê Agrá*, v.37, n.3, p.1643-1654, 2016.
- Oliveira FCE.** Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada à crioprotetores - estudo de toxicidade. 2012. 66f. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.
- Oliveira MS, Almeida-Monteiro PS, Nunes LT, Linhares FRA, Pinheiro JPS, Pinheiro RRR, Ferreira FO, Campello CC, Salmito-Vanderley CSB.** Cryopreservation of tambaqui semen using programmed freezing machine and dry shipper. *Semina Ciê Agrá*, v.37, n.4, p.2167-2180, 2016.
- Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.** Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, v.78, n.1, p.85-98, 2003.
- Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res*, v.63, n.3, p.215-225, 2006.
- Rurangwa E, Kime DE, Oliveira F, Nash JP.** The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v.234, n.1, p.1-28, 2004.
- Saleh RA, Agarwal A.** Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *J Androl*, v.23, n.6, p.737-752, 2002.
- 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, n.1, p.255-268, 2012.
- 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, n.2, p.343-350, 2014.
- Sanocka D, Kurpisz M.** Reactive oxygen species and sperm cells. *Rep Biol Endoc*, v.2, n.1, p.12-18, 2004.
- Sarlós P, Molnár A, Kókai M, Gábor G, Rátky J.** Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung*, v.50, n.2, p.235-245, 2002.
- Sikka SC.** Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*, v.25, n.1, p.5-18, 2004.
- Silva ECB, Guerra MMP.** Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Rev Port Ciê Vet*, v.107, p.143-149, 2012.
- Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP.** In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim*, v. 46, p. 874-881, 2011.
- Słowińska M, Nynca J, Cejko BI, Dietrich MA, Horváth Á, Urbányi B, Kotrik L, Ciereszko, A.** Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*, v. 400, p.101-104, 2013.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA.** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet*, v.25, n.2, p.28-35, 2005.
- Stoss J, Donaldson EM.** Preservation of fish gametes. In: *International Symposium Reproduction Physiology Fish, 1982*, Wageningen. Proceedings... Wageningen, 1982. p. 114-122.
- Turrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, v.552, n.2, p.335-344, 2003.
- Ubilla, A.; Valdebenito, I.** Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability, *Lat Amer J Aquac Res*, v.39, p.338-343, 2011.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT.** Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quí Nova*, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.
- Viveiros ATM, Taffarel TR, Leal MC.** Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. *Neotrop Ichthy*, v.12, n.3, p.643-648, 2014.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Develop*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.
- Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ.** Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*, v.77, n.2, p.190-201, 2007.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, n.61, p.481-492, 2000.