



## Avaliação de diferentes crioprotetores e tempos de descongelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*

*Evaluation of different cryoprotectants and thawing times of tambaqui *Colossoma macropomum* semen*

Dayane Regina Lenz<sup>1</sup>, Mayanny Carla Carvalho Lima<sup>1</sup>, Tayrone Freitas Prado<sup>1</sup>, André de Moura Victório<sup>2,4</sup>, Fernanda Gomes de Paula<sup>3</sup>, Maria Lucia Gambarini Meirinhos<sup>3</sup>, Emmanuel Arnhold<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em ciência animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>3</sup>Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>4</sup>Correspondência: [amvictorio@hotmail.com](mailto:amvictorio@hotmail.com)

### Resumo

O objetivo com o trabalho foi avaliar a eficiência de quatro crioprotetores adicionados ao meio diluidor na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e melhor protocolo de descongelamento. Foram realizadas quatro coletas com intervalos regulares de amostras de sêmen (*pool*) de dez reprodutores. Os crioprotetores testados foram: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e metanol, na proporção de 10,0%. Para a avaliação da qualidade do sêmen após o descongelamento foi realizado o teste *in vivo* das amostras em três protocolos diferentes para cada crioprotetor, com três tempos de descongelamento (15, 30 e 45s) na temperatura de 30°C, totalizando 12 tratamentos com cinco repetições em esquema fatorial. Os resultados da fertilização foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com significância de 0,05. O tratamento que resultou em melhor taxa de fertilização foi o que continha metanol como crioprotetor e o descongelamento no tempo de 30 s, com taxa de fertilização média de 77,65%, sendo, entre os tratamentos avaliados, o mais recomendado para a criopreservação do sêmen de tambaqui.

**Palavras-chave:** congelamento, espermatozoide, taxa de fertilização, tempo de descongelamento.

### Abstract

The objective of the study was to evaluate the efficiency of four cryoprotectants added to the extender on sperm cryopreservation of tambaqui *Colossoma macropomum* and to define the best thawing protocol. Four semen samples were collected at regular intervals from ten breeding males (*pool*). The cryoprotectants tested were: glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF) and methanol at a ratio of 10.0%. For the evaluation of semen quality after thawing *in vivo* test samples in three different protocols for each cryoprotectant was performed with three thawing times (15, 30 and 45s) at 30°C temperature, totalizing 12 treatments with five replicates in factorial design. The results of fertilization were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, with significance of 0.05. The treatment that resulted in improved fertilization rate was the one containing methanol as cryoprotectant and thawing time of 30 s, with a mean fertilization rate of 77.65%, being among the treatments the most recommended for cryopreservation of tambaqui semen.

**Keywords:** cryopreservation, spermatozoa, fertilization rate, thawing time.

### Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie nativa mais produzida no Brasil e, como a maior parte das espécies reofilicas, tem toda sua reprodução em cativeiro feita de maneira artificial. Para que seja aplicado o protocolo de indução hormonal, os reprodutores devem estar em estágio de maturação gonadal avançado, o que pode ocorrer em períodos diferentes entre fêmeas e machos (Salmito-Vanderley et al., 2014; Garcia et al., 2016).

Dessa forma, a manutenção de banco de sêmen criopreservado, em quantidade e qualidade, auxilia na redução dos problemas com desovas assíncronas, possibilitam a realização de programas de melhoramento genético de espécies de importância econômica, programas de preservação de recursos genéticos de populações nativas e/ou endêmicas e programas de repovoamento (Martins et al., 2017a; Martínez-Páramo et al., 2017).

A criopreservação de sêmen é uma técnica que visa à conservação de material genético em nitrogênio líquido a -196°C, temperatura em que a funcionalidade das células espermáticas e suas estruturas são conservadas e sua viabilidade é mantida para usos futuros (Carneiro, 2007; Salmito-Vanderley et al., 2014).

O sucesso do processo de criopreservação depende do estabelecimento do melhor protocolo de congelamento e descongelamento que, até a produção deste trabalho, ainda não foi estabelecido em todos os detalhes. A composição dos diluentes, tipo e concentração dos crioprotetores extracelulares e intracelulares,



assim como sua combinação, e método de congelamento e descongelamento podem afetar a qualidade final do sêmen (Varela Júnior et al., 2012a).

Crioprotetores intracelulares são substâncias químicas não tóxicas capazes de penetrar nas células e retirar a água e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, o que impede que se formem cristais de gelo intracelulares que causam danos irreversíveis às células durante o congelamento (Carneiro, 2007). A literatura cita testes com dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, glicerol e amidas, com resultados diversos (Le et al., 2011; Viveiros et al., 2011; Varela Júnior et al., 2012a; Varela Júnior et al., 2012b).

O descongelamento é a etapa em que ocorre a reidratação celular. Assim como no congelamento, a velocidade deve ser controlada, pois não deve permitir que pequenos cristais intracelulares aumentem de tamanho a ponto de causar danos às células. A taxa de descongelamento deve ser determinada para cada espécie e varia conforme a temperatura da água de imersão do sêmen (Carneiro, 2007).

Os poucos estudos existentes avaliam, em sua maioria, características *in vitro* do sêmen, que podem mascarar o estado bioquímico das células (Martins et al., 2017b). De acordo com Melo-Maciel et al. (2012) nenhum método é mais seguro e apropriado para avaliar a qualidade do sêmen que a sua taxa de fertilização, por isso este estudo teve como objetivo determinar qual o crioprotetor intracelular e tempo de descongelamento do sêmen de tambaqui criopreservado produzem melhores resultados na fertilização de ovócitos.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2012 a janeiro de 2014, nos setores de Piscicultura e de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG), *Campus* II – Samambaia, em Goiânia-GO. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (Protocolo 059/12).

### Colheita de sêmen

Foram selecionados dez exemplares machos da espécie tambaqui, sexualmente maduros, com idade mínima de três anos, com peso entre 2,8 e 6,0 kg (média de  $4,1 \pm 1,1$ kg), que liberaram sêmen com leve pressão abdominal sem indução hormonal. Após a seleção, os indivíduos foram identificados individualmente através de marcação colorida no primeiro raio da nadadeira dorsal, pesados e encaminhados ao laboratório de reprodução de peixes do setor de Piscicultura da EVZ-UFG, onde foram acondicionados em caixas d'água de volume de 1000 L com fluxo de água contínuo e submetidos à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa, na dose de 2,0 mg/kg, diluído em solução salina de NaCl 0,9%, no volume de 0,5 mL/kg e aplicado via intraperitoneal. Decorridas 12 horas da indução hormonal os indivíduos foram submetidos à extrusão dos gametas por pressão abdominal no sentido céfalo-caudal, realizada em meio seco, sem presença de água, urina ou sangue. O sêmen foi coletado em seringas graduadas de 10,0 mL previamente identificadas com o nome de identificação de cada reprodutor e o número da amostra coletada.

Para cada amostra foi realizado o teste de contaminação, que consistiu em avaliar a motilidade espermática com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 400X, em que foram rejeitadas as amostras que apresentarem mais de 1,0% de motilidade no campo óptico sem a ativação com água. Atestada a ausência de contaminação nas amostras, o sêmen foi acondicionado em caixa térmica com gelo, na temperatura de aproximadamente 5,0°C e transportado ao setor de Reprodução Animal da EVZ-UFG onde foi submetido ao processo de congelamento.

Foram realizadas três coletas de sêmen em intervalos regulares de 30 dias, dos mesmos reprodutores. Para reduzir a ocorrência de variações individuais, a cada coleta realizou-se o congelamento de um *pool* dos reprodutores que não apresentaram contaminação, sendo este *pool* separado em alíquotas nas palhetas. Para o descongelamento, realizou-se um a mistura de uma palheta de cada período de coleta, para reduzir a variação induzida pela sazonalidade. As avaliações do sêmen coletado estão apresentados na Tab. 1.

Tabela 1. Variáveis seminais do sêmen fresco coletado de tambaqui *Collossoma macropomum*.

Variável	Coleta		
	<i>Pool</i> 1	<i>Pool</i> 2	<i>Pool</i> 3
Motilidade espermática (0-100%)	90	80	80
Vigor espermático (0-5)*	4,0	4,0	4,0
Longevidade (s)	344,8	255,0	96,0
Concentração espermática ( $\times 10^9$ )mL <sup>-1</sup> )	24,8	7,0	8,7

\*Vigor espermático foi avaliado subjetivamente de acordo com a robustez de movimentação celular, atribuindo-se um escore de zero a cinco, em função da velocidade e progressão de movimento dos espermatozoides.



Após a primeira coleta os reprodutores foram acondicionados em viveiro de 50 m<sup>2</sup> de área de lâmina d'água, previamente desinfetados e adubados e com renovação de água constante, onde foram mantidos durante o período de coletas, sendo retirados apenas para o manejo reprodutivo. A alimentação dos reprodutores foi realizada uma vez a cada dois dias, no final da tarde, com ração extrusada comercial para peixes carnívoros produzida pela VB Alimentos Ltda., de 42% de proteína bruta e *pellets* de 10-12 mm, na taxa de 0,5% do peso vivo.

### *Criopreservação*

As amostras de sêmen de todos os reprodutores foram misturadas na mesma proporção formando um *pool* de sêmen, que foi objeto de congelamento. Em cada coleta o *pool* seminal foi dividido em quatro alíquotas de igual volume, adicionadas ao meio diluente à base de gema de ovo (20,0%), glicose (5,0%) e solução salina NaCl 0,9% (65,0%) na diluição 1:4 (sêmen/solução). Nesta etapa foram adicionados os quatro crioprotetores (quatro tratamentos): glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e metanol, na proporção de 10,0%.

Cada meio diluente foi preparado previamente e armazenado em refrigerador, na temperatura aproximada de 5°C, para que não houvesse choque térmico do sêmen quando misturado à solução crioprotetora. Somente a gema de ovo foi adicionada ao meio diluidor minutos antes da diluição do sêmen no meio, a fim de não perder as suas propriedades.

Após homogeneizadas, as alíquotas de cada crioprotetor foram envasadas em palhetas de 0,5 mL em 15 amostras para cada meio crioprotetor em seguida foram colocadas em *racks* de alumínio, devidamente identificadas e alocadas em canecas de um botijão com vapor de nitrogênio do tipo *dry shipper*, série Vapor Shipper MVE SC-4/2V da marca Volta, enchido 24 horas antes do uso, estabilizado a -180,0°C, onde permaneceram por duas horas, e então, foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido onde permaneceram armazenadas durante o período do experimento a temperatura de -196,0°C.

### *Descongelamento*

O descongelamento foi realizado com auxílio de banho-Maria pré-ajustado na temperatura de 30°C. As palhetas foram mergulhadas em tempos de 15, 30 e 45 s. Em cada descongelamento foi selecionada uma palheta de cada um dos três períodos de coleta de cada meio crioprotetor, que posteriormente foram cortadas com auxílio de cortador de palhetas e o sêmen descongelado das palhetas foi misturado para a realização da fertilização dos ovócitos em cada repetição, representada por uma incubadora.

### *Avaliação do sêmen in vivo*

Para a avaliação do sêmen *in vivo* foi realizada reprodução artificial, com a seleção de duas fêmeas maduras, escolhidas subjetivamente pela aparência da papila urogenital, do abdômen e canulação intra-ovariana. Após a seleção, as matrizes foram encaminhadas ao laboratório de reprodução, onde foram acondicionadas em caixas d'água de volume de 1000 L com fluxo de água contínuo e submetidas à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa na dose de 5,5 mg/kg de peso vivo, diluído em solução salina de NaCl 0,9% aplicado via intraperitoneal, em duas doses de 0,5 mg/kg e 5,0 mg/kg respectivamente com intervalo de 12 horas entre doses. Após a aplicação da segunda dose de hormônio foi realizada a contagem de 260 horas-grau, para a extrusão dos ovócitos por pressão abdominal no sentido céfalo-caudal em meio e recipiente seco, sem presença de água, urina ou sangue.

Para a fertilização, os ovócitos das duas fêmeas foram misturados em igual proporção e divididos em 60 alíquotas de 1 g cada em recipientes secos, seguindo protocolo de Menezes et al. (2008) e Garcia et al. (2015). Foi utilizado o sêmen pós-descongelamento dos quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento, com cinco repetições (cada incubadora sendo considerada uma repetição) Os gametas foram misturados em meio seco e em seguida ativados com água das incubadoras, e incubados em incubadoras experimentais confeccionadas com garrafas tipo PET e tela de poliamida com malhas de 1 mm entre nós, com volume útil de 1,0 L e fluxo de água contínuo na densidade aproximada de 1,0 g de ovo/L.

A taxa de fertilização foi estimada após os embriões terem atingido o estágio de gástrula inicial, momento em que a água de cada incubadora foi drenada e os embriões foram fixados em solução de formol salina tamponada (10,0%), em recipiente fechado e identificado. A taxa de fertilização foi determinada por contagem direta, através da relação percentual entre embriões viáveis e o total de ovos incubados.

### *Delineamento experimental e análise estatística*

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial entre



quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento, perfazendo 12 tratamentos com cinco repetições.

Os resultados do teste de fertilização foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Foi adotado nível de 0,05 de significância em todos os testes, que foram realizados com o auxílio do *software* R (R Development Core Team, 2012).

### Resultados e Discussão

Os resultados do teste de fertilização com o sêmen descongelado estão apresentados na Tab. 2. Não foi possível a realização de avaliação *in vitro* do sêmen pós-congelamento.

Tabela 2. Valores médios da taxa de fertilização (%) de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) nos meios de congelamento com quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento, seguidos pelas médias globais dos crioprotetores (linhas) e tempos de descongelamento (colunas) e valor de probabilidade com significância de 0,05.

Crioprotetor	Tempo de descongelamento (s)			Média	P*	P**	P***
	15	30	45				
DMF	46,79 ± 3,03 <sup>BB</sup>	60,35 ± 3,90 <sup>AB</sup>	41,94 ± 1,79 <sup>CC</sup>	49,69 ± 9,54 <sup>C</sup>			
DMSO	42,24 ± 2,85 <sup>CC</sup>	62,97 ± 1,12 <sup>AB</sup>	51,84 ± 2,50 <sup>BB</sup>	52,35 ± 10,37 <sup>B</sup>			
Glicerol	37,05 ± 1,29 <sup>BD</sup>	43,13 ± 1,46 <sup>AC</sup>	36,35 ± 1,07 <sup>BD</sup>	38,84 ± 3,73 <sup>D</sup>	<0,001	<0,001	<0,001
Metanol	64,92 ± 2,15 <sup>BA</sup>	77,65 ± 5,92 <sup>AA</sup>	64,20 ± 1,96 <sup>BA</sup>	68,92 ± 7,57 <sup>A</sup>			
Média	47,75 ± 12,12 <sup>b</sup>	61,02 ± 14,15 <sup>a</sup>	48,58 ± 12,22 <sup>b</sup>				

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas são diferentes nas linhas e médias seguidas de letras diferentes maiúsculas são diferentes nas colunas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. \*Valor de probabilidade referente ao teste F da análise de variância do crioprotetor. \*\*Valor de probabilidade referente ao teste F da análise de variância do tempo de descongelamento. \*\*\*Valor de probabilidade referente ao teste F da análise de variância da interação entre o crioprotetor e o tempo de descongelamento

Houve diferença nas taxas de fertilização entre os meios com diferentes crioprotetores ( $P^* < 0,001$ ) e os tempos de descongelamento das amostras ( $P^{**} < 0,001$ ).

Entre os crioprotetores, todos apresentaram diferença entre si, mostrando-se como o melhor crioprotetor testado o metanol, com taxa de fertilização média de 68,92%, seguido do DMSO, com taxa de fertilização média de 52,35%, DMF com taxa de fertilização média de 49,69% e glicerol, com taxa de fertilização média de 38,84%.

Entre os tempos de descongelamento, 30 s apresentou melhores taxas de fertilização com 61,02%. Já 15 e 45 s, apresentaram resultados inferiores de 47,75% e 48,58% respectivamente, mas não diferiram significativamente entre si.

Houve interação entre os crioprotetores e o tempo de descongelamento ( $P^{***} < 0,001$ ). A interação pode ser percebida nos tratamentos com os crioprotetores DMF e DMSO, em ambos os tratamentos o tempo de descongelamento de 30 s apresentou resultados superiores (DMF = 60,35% e DMSO = 62,97%). Porém, no tratamento com DMF a segunda melhor taxa de fertilização foi observada no descongelamento em 15 s (46,79%), seguido pelo tempo de 45 s com taxa de fertilização média de 41,94%. Já para o tratamento com DMSO a segunda melhor taxa de fertilização foi observada no descongelamento em 45 s (51,84%) seguido pela taxa de fertilização média do tempo de 15 s (45,24%).

Desdobrando a interação entre os tratamentos, pode-se observar que os tratamentos que continham metanol como crioprotetor foram superiores para todos os tempos de descongelamento, sendo as taxas de fertilização médias de 64,92% para 15 s, 77,65% para 30 s e 64,20% para 45 s.

Os resultados obtidos no experimento divergiram dos encontrados por Varela Júnior et al. (2012a) que avaliaram o uso de amidas em comparação ao DMSO (10%) e glicerol (5%) como crioprotetores intracelulares para sêmen de tambaqui e observaram que melhores resultados de taxas de fertilização, eclosão e integridade dos espermatozoides ocorreram nas amostras criopreservadas com o uso de amidas, incluindo a DMF, em que os autores observaram taxas de fertilização média de 91,6%, superiores às observadas no presente trabalho.

No entanto, os resultados obtidos corroboram aos encontrados por Ramirez-Merlano et al (2011) em ensaios de criopreservação de sêmen de *Piaractus brachypomus*, em que o uso de DMSO e metanol como crioprotetores produziram as melhores taxas de fertilização, acima de 71%, com uso do sêmen pós-descongelamento. A eficiência do agente crioprotetor no processo de congelamento de uma célula pode variar em função do tipo de célula a ser criopreservada, levando-se em consideração o tipo de animal e a espécie. Além disso, a concentração e o tempo de exposição ao crioprotetor antes do congelamento podem produzir diferenças na viabilidade das células criopreservadas (Castro et al., 2011).



O crioprotetor intracelular deve ser um composto que consiga penetrar na célula por difusão passiva, causando desidratação na célula e protegendo-a contra as injúrias do congelamento. A permeabilidade do crioprotetor na célula está relacionada ao baixo peso molecular do mesmo (Purdy, 2006). Dentre os crioprotetores testados, metanol é o que apresenta o menor peso molecular, o que aumentaria a velocidade de penetração na célula e, conseqüentemente, proveria uma maior proteção durante o processo de criopreservação, evitando a formação de cristais de gelo que podem romper as estruturas celulares.

Piores resultados observados com o uso de glicerol podem ser devido ao fato de que o glicerol pode causar efeito tóxico à célula espermática. McClean et al. (2008) observaram danos estruturais na membrana celular e mitocondrial com uso de glicerol como crioprotetor, danos que não foram observados nos tratamentos com DMSO. Viveiros et al. (2009) também observaram piores resultados de qualidade espermática pós-descongelamento com uso do glicerol como crioprotetor em combinação com diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de *Salminus brasiliensis*, no referido trabalho, DMSO apresentou os melhores resultados de qualidade espermática, porém as taxas de fertilização observadas em todos os tratamentos foram insatisfatórias (17 a 23%). Além disso o uso do glicerol como crioprotetor pode causar desnaturação proteica e modificações nas interações de actina da cauda do espermatozoide, o que interfere na movimentação dos espermatozoides e, conseqüentemente, no processo de fertilização (Alvarenga et al., 2000; Varela Júnior et al., 2012b). Chew et al. (2010) avaliaram o tempo de descongelamento do sêmen de *Probarbus jullieni* a 40°C por seis, sete, oito, dez, 20 e 30 segundos e observaram que maior taxa de motilidade ocorreram quando o descongelamento por sete segundos, com média de 55%, sendo que a partir de dez segundos imersas em água para descongelamento, as amostras apresentaram redução drástica da motilidade percentual, com valores de motilidade abaixo de 10%.

Viveiros et al. (2012a) avaliaram tempo e temperatura de descongelamento do sêmen criopreservado de pirapitinga do Sul (*Brycon opalinus*) e observaram que o descongelamento a temperatura de 60°C por oito segundos proporcionou melhores resultados de motilidade espermática e duração do tempo de motilidade do que a 30°C, tanto para recipientes de envase de 0,5 e 4,0 mL.

Para a matrinxã (*Brycon natterii*) os resultados de motilidade espermática percentual e vigor espermático não diferiram para descongelamento a 30°C por 16 segundos ou 50°C e 60°C por oito segundos (Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2012b).

O estado e a viabilidade das células espermáticas após a criopreservação dependem da capacidade da célula de resistir a uma série de mudanças físicas, químicas e fisiológicas que ocorrem durante o processo de descongelamento (Andreev et al., 2009).

Os piores resultados observados foram nos tratamentos com glicerol para todos os tempos de descongelamento, sendo que para esse crioprotetor o tempo de descongelamento de 30 s produziu melhor taxa média de fertilização (43,13%) em relação aos tempos de descongelamento de 15 s (37,05%) e 45 s (36,35%), que não diferiram entre si.

A comparação do tempo de descongelamento com outros trabalhos é dificultada pela ausência de padronização na metodologia. Podemos observar trabalhos que utilizam de 5 a 45 segundos em temperatura de 30°C até 60°C, para palhetas de 0,5 mL. A falta de definição do protocolo adequado para cada espécie pode ser a causa de taxas de fertilização muito baixas, abaixo do aceitável para reprodução e com grande diferença em relação ao uso de sêmen fresco, como os resultados de fertilização encontrados por Garcia et al. (2015) para tambaqui e Viveiros et al. (2009) para dourado *Salminus brasiliensis*. Neste trabalho observamos que tempo de descongelamento de 30 segundos foi significativamente superior, mostrando que nessa etapa podem ocorrer mudanças estruturais na célula que afetam a taxa de fertilização.

### Conclusão

Entre os crioprotetores testados no experimento, metanol resultou em melhores taxas de fertilização. O melhor tempo de descongelamento foi de 30s, para a temperatura de 30°C.

No teste de interação, os tratamentos testados (crioprotetor e tempo de descongelamento), o uso do metanol como crioprotetor com tempo de descongelamento de 30 s na temperatura de 30°C resultou na melhor taxa de fertilização, sendo o tratamento recomendado para a criopreservação do sêmen de tambaqui.

### Referências

- Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, v.32, p.541-545, 2000.
- Andreev AA, Sadikova DG, Gakhova EN, Pashovkin TN, Tikhomirov AM. Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. *Biophysics*, v.54, n.5, p.612-616, 2009.
- Carneiro PCF. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31,



n.3, p.361-366, 2007.

**Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Sci Vet*, v.39, n.2, p.1-17, 2011.

**Chew PC, Hassan R, Rashid ZA, Chuah HP.** The current status of sperm cryopreservation of the endangered *Probarbus jullieni* (Sauvage) in Malaysia. *J Appl Ichthyol*, v.26, p.797-805, 2010.

**Garcia RRF, Vasconcelos ACN, Povh JA, Oberst ER, Varela Jr AS, Corcini CD, Streit Jr CD.** Functional integrity of *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. *Neotrop Ichthyol*, v.13, n.3, p.599-606, 2015.

**Garcia RRF, Streit DP, Cabrita E, Godoy LC.** Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges. In: Marco-Jiménez F & Akdemir H (Ed.). *Cryopreservation in Eukaryotes*. Rijeka: Intech, 2016, p. 55-74. Disponível em <http://www.dx.doi.org/10.5772/65037>. Acesso em 27 jul. 2017.

**Le MH, Lim HK, Min BH, Park MW, Chang YJ.** Semen cryopreservation of yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *Rev Fish Biol Fish*, v.21, p.789-797, 2011.

**Martínez-Páramo S, Horváth A, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch TR, Cabrita E.** Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, v.472, p.156-177, 2017.

**Martins EFF, Streit Júnior DP, Abreu JS, Corrêa-Filho RAC, Oliveira CAL, Lopera-Barrero NM, Povh JA.** Ovipel and carp pituitary extract for the reproductive induction of *Collossoma macropomum* males. *Theriogenology*, v.98, p.57-61, 2017a.

**Martins MIM, Souza AK, Trautwein LGC.** Subpopulações espermáticas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, p.243-247, 2017b.

**McClellan R, Holt WV, Zee YP, Lisle A, Johnston SD.** The effect of cryoprotectant on kangaroo sperm ultrastructure and mitochondrial function. *Cryobiology*, v.57, p.297-303, 2008.

**Melo-Macieli MAP, Salmito-Vanderley CSB, Leite LV, Oliveira CS, Oliveira MS, Lopes JT, Nunes JF.** Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. *Ciênc. Anim*, v.22, n.1, p.269-283, 2012.

**Menezes JTB, Queiroz LJ, Doria CRC, Menezes Jr JB.** Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amazonica*, v.38, n.2, p.365-368, 2008.

**Oliveira AV, Viveiros ATM, Maria AN, Freitas RTF, Isau ZA.** Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, n.6, p.1509-1515, 2007.

**Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006.

**R Development Core Team.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <http://www.R-project.org>. Acesso em 30 mar. 2012.

**Ramirez-Merlano JA, Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas PE.** Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). *Aquacult Res*, v.42, p.738-745, 2011.

**Salmito-Vanderley CSB, Pinheiro JPS, Almeida PS, Lopes JT, Leite LV.** Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação de sêmen de peixes characiformes. *Acta Vet Brasilica*, v.8, p.343-350, 2014.

**Varela Júnior AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim, RD, Lucia Júnior T, Streit Júnior DP, Figueiredo MRC.** Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Collossoma macropomum*. *Theriogenology*, v.78, p.244-251, 2012a.

**Varela Júnior AS, Corcini CD, Streit Júnior DP, Rizzoto G, Jardim RD, Lucia Júnio T, Figueiredo MRC.** Efeito crioprotetor de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Collossoma macropomum*. *Atlantica*, v.34, p.129-137, 2012b.

**Viveiros ATM, Oliveira AV, Maria AN, Órfão LH, Souza JC.** Sensibilidade de espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.61, n.4, p.883-889, 2009.

**Viveiros ATM, Amaral TB, Orfão LH, Isau ZA, Caneppele D, Leal MC.** Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes) effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquacult Res*, v.42, p.858-865, 2011.

**Viveiros ATM, Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Caneppele D.** Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, v.78, p.361-368, 2012a.

**Viveiros ATM, Maria AN, Amaral TB, Orfão LH, Isau ZA, Veríssimo-Silveira R.** Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Aquacult Res*, v.43, p.546-555, 2012b.