



Vitrificação de sêmen de peixes teleósteos

Vitrification of teleosts fish semen

Priscila Silva de Almeida-Monteiro¹, Mayara Setúbal Oliveira-Araújo¹, Jéssica de Sousa Castelo Branco¹, Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley^{1,2}

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias¹, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.
Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE. CEP: 60714-903²

Resumo

A preservação de sêmen de peixes é uma técnica promissora para o desenvolvimento da aquicultura, e consiste na conservação dos gametas masculinos a longo prazo. Dentre os procedimentos de criopreservação de sêmen de peixes, a vitrificação vem sendo desenvolvida como uma alternativa à criopreservação convencional devido à sua rapidez, praticidade e baixo custo. Apesar dos benefícios, essa técnica possui alguns entraves que limitam seu sucesso, uma vez que consiste em mergulhar a amostra diretamente em nitrogênio líquido, necessitando de grandes quantidades de crioprotetores de ação interna, que podem ser tóxicos. Dessa forma, diferentes protocolos precisam ser testados, a fim de obter resultados satisfatórios após a aplicação da técnica. A vitrificação tem sido utilizada com sucesso para sêmen, ovócitos, embriões e tecidos de mamíferos e, atualmente, alguns protocolos de vitrificação de sêmen já foram elaborados para determinadas espécies de peixes com relativo sucesso, contudo mais estudos são necessários para aumentar a viabilidade espermática após o reaquecimento. Portanto, o objetivo desta revisão é resumir os procedimentos básicos do processo de vitrificação de sêmen de peixes e apresentar os principais resultados encontrados na literatura.

Palavras-chave: conservação seminal, congelamento rápida, espermatozoide.

Abstract

The preservation of fish semen is a promising technique for the development of aquaculture, and consists in the conservation of male gametes in the long term. Among the procedures for cryopreservation of fish semen, vitrification has been developed as an alternative to conventional cryopreservation due to its speed, practicality, and low cost. Despite the benefits, this technique has some obstacles that limit its success, since it consists of immersing the sample directly into liquid nitrogen, requiring large amounts of internal cryoprotectants, which can be toxic. Thus, different protocols need to be tested in order to obtain satisfactory results after the application of the technique. Vitrification has been successfully used for semen, oocytes, embryos and mammalian tissues, and currently some semen vitrification protocols have been developed for certain species of fish with relative success, however further studies are needed to increase sperm viability after warming. Therefore, the purpose of this review is to summarize the basic procedures of the fish semen vitrification process and present the main results found in the literature.

Keywords: seminal conservation, fast freezing, sperm.

Introdução

A vitrificação é uma técnica de criopreservação em que o sêmen é imerso diretamente em nitrogênio líquido e tem como vantagens a simplicidade, o baixo custo e a rapidez (Figueroa et al., 2015). Apesar dos benefícios, esta técnica expõe os espermatozoides a condições fisiologicamente inadequadas, o que leva a danos celulares ocasionados por choque osmótico e térmico, estresse oxidativo e alterações bioquímicas do plasma seminal, reduzindo a qualidade espermática (Watson, 1995).

Para manter o espermatozoide em baixa temperatura, é indispensável a utilização de um protocolo adequado, que depende da qualidade e quantidade do diluente, tipo e concentração dos crioprotetores, volume da amostra e características das células (Kopeika e Kopeika, 2008). Para o processo de vitrificação é necessário usar grandes quantidades de crioprotetor, o que gera efeitos tóxicos às células, devendo-se, portanto, tomar algumas precauções para o sucesso da técnica, tais como: reduzir ao mínimo o volume da solução de vitrificação, de forma a aumentar as taxas de

¹Correspondência: sandra.salmito@uece.br

Recebido: 17 de julho de 2019

Aceito: 21 de outubro de 2019

congelamento/reaquecimento, e utilizar dispositivos de envase apropriados, pois os fatores decisivos para uma vitriificação bem-sucedida são evitar a cristalização intracelular e a toxicidade (Xin et al., 2017). A vitriificação tem sido utilizada com sucesso para espermatozoides, embriões, ovócitos, células-tronco e tecidos de várias espécies de mamíferos (Bagchi et al., 2008), e alguns estudos mostram as possibilidades de aplicação desta técnica para peixes. As pesquisas com vitriificação de sêmen de peixe concentram-se principalmente na toxicidade do crioprotetor de ação interna em várias concentrações, tempos de exposição e temperaturas de reaquecimento, tendo sido testada com sucesso limitado em diversas espécies (Quadro 1). Dessa forma, o objetivo desta revisão é resumir os procedimentos básicos do processo de vitriificação de sêmen de peixes e apresentar os principais resultados encontrados na literatura.

Biocnologia da conservação de sêmen: criopreservação

A criopreservação de sêmen consiste na conservação, a longo prazo, dos gametas masculinos por meio de congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C), em que pode ter sua estrutura e funcionalidade conservadas, mantendo-os inativos e viáveis por tempo indeterminado (Bakhach, 2009). Essas biotécnicas beneficiam o estabelecimento de programas de melhoria genética, com a utilização de machos selecionados, eliminação do problema de assincronia da atividade reprodutiva entre machos e fêmeas e redução do número de reprodutores machos mantidos na estação de piscicultura, com consequente redução dos custos (Godinho, 2007).

Para congelar sêmen é necessário o uso de um meio de congelamento, composto por diluentes e crioprotetores. Esse meio é responsável por nutrir a célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelamento e o reaquecimento seminal, sendo essencial para o sucesso da criopreservação (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Os procedimentos de congelamento podem ser feitos de forma lenta (método convencional) ou de forma rápida (vitriificação) (Merino et al., 2012; Figueroa et al., 2015). Na congelamento lenta são utilizadas baixas concentrações de crioprotetores, devendo haver um tempo de equilíbrio para que o crioprotetor possa penetrar nas células, e a temperatura é reduzida de forma gradual, necessitando para isso de um equipamento apropriado, como caixa isotérmica, *dry shipper* ou máquinas de congelamento programáveis (Naik et al., 2005). Já na vitriificação, não é preciso tempo de equilíbrio nem uso de equipamentos sofisticados, pois a amostra é imersa diretamente em nitrogênio líquido, sendo necessário utilizar altas concentrações de crioprotetores, a fim de remover o máximo possível de água das células, o que induz à solidificação das células, tornando-as uma substância vítrea amorfa, e previne a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (Carneiro, 2007)

O primeiro trabalho sobre a congelamento convencional de sêmen de peixes foi realizado por Blaxter (1953), que congelou sêmen de arenque do atlântico (*Clupea harengus*), possibilitando o cruzamento de populações que desovam em diferentes épocas do ano (Liu et al., 2006). Já foram determinados protocolos de criopreservação seminal para mais de 200 espécies de peixes, tanto de água doce quanto marinhos (Billard e Zhang, 2001; Gwo, 2011). Já o processo de vitriificação foi realizado pela primeira vez para preservação de sêmen de sapo, após desidratação em sacarose, por Luyet e Hoddap (1938). Desde então, pesquisas sobre a vitriificação de células germinativas, e até mesmo de tecidos e embriões, têm sido relatadas para diferentes espécies.

Aspectos gerais da vitriificação

A vitriificação é uma técnica ainda em fase de desenvolvimento e expansão na tecnologia de sêmen. Sua grande vantagem em relação à criopreservação tradicional consiste no fato de que não há formação de grandes cristais de gelo hexagonais intracelulares. Para evitar a formação de tais cristais, suspensões pequenas do líquido devem ser resfriadas muito rapidamente para alcançar o ultracongelamento: o aumento da pressão hidrostática reduz a temperatura de nucleação homogênea, permitindo uma maior transição vítrea (Luyet e Hoddap, 1938). Além disso, é necessário utilizar elevadas concentrações de crioprotetores de ação interna, que proporcionam maior viscosidade à solução, fazendo com que ele se comporte como um sólido (Ali e Shelton, 1993; Rubinsky, 2003, Carneiro, 2007). Isso acontece porque, quando um líquido é resfriado rapidamente a baixíssimas temperaturas ele se transforma em um estado altamente viscoso e amorfo, conhecido como estado vítreo sólido, ou seja, um fluido com as propriedades mecânicas de um sólido (Rubinsky, 2003; Naik et al., 2005). A formação desse estado vítreo pode ser distinguida pela aparência após mergulhar as amostras em nitrogênio líquido, pois a



amostra permanece transparente, enquanto a amostra se torna branca leitosa se ocorrer cristalização (Ali e Shelton, 2007).

Soluções para vitrificação

Antes da vitrificação, é necessário que a amostra seja diluída em uma solução adequada, composta, basicamente, por diluentes e crioprotetores, que irão nutrir e proteger as células durante o processo. Essas soluções têm sua eficácia dependente da espécie a qual está sendo aplicada (Quadro 1), sendo necessário testar as soluções mais adequadas. Um dos diluentes mais comuns para a criopreservação convencional é a glicose, podendo ser utilizada também para a congelamento rápida. Contudo, diluentes mais complexos são mais comumente utilizados para vitrificação de sêmen de peixes, como o *Belltsville Thawing Solution* (BTS) (Varela-Jr et al., 2015), meio Cortland® (Merino et al., 2011; Figueroa et al., 2013, 2015), meio Tanaka modificado (Kásar et al., 2016) e Tris-HCl (Andreev et al., 2009; Abed-Elmdoust et al., 2015).

Dentre os principais crioprotetores de ação interna estão dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol (EG), metanol e propilenoglicol, que aumentam a viscosidade intracelular, impedindo a cristalização da água e permitindo a formação do estado vítreo (Ali e Shelton, 2007). Em peixes, os crioprotetores mais utilizados são os de baixo peso molecular e com menor toxicidade, como o DMSO e o EG, que têm rápida permeabilidade celular e são pouco afetados pela temperatura (Cuevas-Uribe et al., 2015; Figueroa et al., 2015; Gwo et al., 2009; Gwo, 2011). Metanol e glicerol também já foram utilizados, porém sem sucesso, devido à sua alta toxicidade e consequentes efeitos hipertônicos às células (Vasconcelos, 2014). Contudo, a reação a um crioprotetor de ação interna difere de uma espécie para outra (Quadro 1).

Associar diferentes crioprotetores de ação interna pode ser uma boa solução para reduzir a toxicidade das altas concentrações necessárias para a vitrificação, uma vez que são usadas menores quantidades de cada um, além de haver uma agregação das propriedades dos crioprotetores combinados (Ali e Shelton, 2007). Uma das associações de crioprotetores mais comumente utilizadas para vitrificação de gametas de mamíferos é a de DMSO com EG. Enquanto o DMSO é um melhor formador do estado vítreo, o EG é menos tóxico e penetra mais rápido (Quinn, 2010). Essa combinação também já foi utilizada para vitrificar sêmen de truta marrom (*Salmo trutta trutta*) e de duas espécies de cioba (*Lutjanus campechanus* e *Rachycentron canadum*), obtendo-se resultados satisfatórios de taxa de motilidade pós-reaquecimento (Cuevas-Uribe et al., 2015).

Substâncias de alto peso molecular, como os dissacarídeos, podem agir como crioprotetores de ação externa, que irão prevenir tanto a cristalização durante a congelamento, como a recristalização durante o reaquecimento. Como exemplos de crioprotetores de ação externa, pode-se citar sacarose, albuminas, gema de ovo, trealose, hidroxietila e polietilenoglicóis, (Ali e Shelton, 2007). Assim, utilizar esse tipo de crioprotetor, juntamente com os de ação interna, pode proporcionar resultados mais satisfatórios, pois, além de proteger as células externamente, permite que seja utilizada uma quantidade menor de protetores de ação interna, que são tóxicos (Fuller, 2004). Figueroa et al. (2013) obtiveram bons resultados na vitrificação de sêmen de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando 0,13 M de sacarose, enquanto Merino et al. (2011) utilizaram 0,125 M para a mesma espécie, também obtendo altas taxas de motilidade espermática (acima de 79%). Figueroa et al. (2015) também vitrificaram sêmen de salmão do atlântico (*Salmo salar*) utilizando 0,13 M de sacarose, alcançando excelentes resultados de motilidade (até 44%), de fertilização (até 46,2%), integridade de membrana plasmática (até 98,4%), potencial de membrana mitocondrial (até 47,2%) e fragmentação de DNA (até 16,8%). Boas taxas de motilidade também foram alcançadas por Cuevas-Uribe et al. (2015), que utilizaram 0,25 M de trealose na solução de vitrificação de sêmen de redfish (*Sciaenops ocellatus* – 17%) e de cioba (*Lutjanus campechanus* – 43%).

Outras substâncias podem ser adicionadas à solução de vitrificação para auxiliar na proteção à célula espermática, como a albumina sérica bovina (BSA), proteína mais abundante no plasma sanguíneo e que tem a capacidade de fazer ligações reversíveis a uma grande variedade de substâncias, atuando como um excelente transportador (Góes Filho, 2005). Estudos têm demonstrado que a BSA age diretamente sobre as membranas, impedindo as células de se aderirem umas às outras e a superfícies plásticas e de vidro devido à sua propriedade surfactante, além disso, também age como antioxidante, protegendo a membrana celular da peroxidação lipídica (Lewis et al., 1997). Pesquisas utilizando 2% de BSA para vitrificação de sêmen de *Oncorhynchus mykiss* (Figueroa et al., 2013) e *Salmo salar* (Figueroa et al., 2015) obtiveram bons resultados de motilidade (até 44%, para *S. salar*), fertilização (até 31% e até 46,2%, respectivamente), integridade de DNA (até 88,9% e até 90,8%, respectivamente) e de membrana



Quadro 1. Principais metodologias para a vitriificação de sêmen de peixes.

Solução de vitriificação	Espécie	Volume	Dispositivo	Taxa de reaquecimento	Motilidade	Referência
30 mM Tris + 5% Sac + 5% Manitol + 10% DMSO	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	10 µL	Criotubo	34-36°C por 20-40 s	12%	Andreev et al., 2009
Cortland® + 1%BSA + 0,125 M Sac + 40% PS	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gotas de 20 µL	Criotubo	37°C (agitação intensa)	82%	Merino et al., 2011
Cortland® + 10%DMSO + 2%BSA + 0,13M Sac + 40% PS	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gotas de 30 µL	Criotubo	37°C por 60 s	97% *	Figueroa et al., 2013
BTS + 10, 20% MeOH	<i>Prochilodus lineatus</i>	20 µL	Palhetas (0,25 mL)	40°C por 10 s	0%	Vasconcelos, 2014
100 mM Tris-HCl + 10 µM AFP III	<i>Acipenser persicus</i>	Gotas de 5 mm de diâmetro	Criotubo	37°C por 5-10 min	16%	Abed-Elmdoust et al., 2015
Cortland + 10% DMSO + 2% BSA + 0,13M Sac + 50% PS	<i>Salmo salar</i>	990 µL (33 gotas de 30 µL)	Criotubo	37°C por 45 s	44%	Figueroa et al., 2015
BTS + 5, 10, 15 ou 20% DMSO	<i>Colossoma macropomum</i>	0,25 mL	Palhetas (0,25 mL)	45°C por 5 s	0%	Varela Jr et al., 2015
C-F HBSS + 10% DMSO + 30% EG + 0,25M Tre	<i>Lutjanus campechanus</i>	10 µL	<i>Cryoloop</i>	24°C por 10 s	43%	Cuevas-Uribe et al., 2015
C-F HBSS + 10% DMSO + 30% EG + 0,25M Tre	<i>Sciaenops ocellatus</i>	10 µL	<i>Cryoloop</i>	24°C por 10 s	17%	Cuevas-Uribe et al., 2015
15% MeOH + 15% PG	<i>Perca fluviatilis</i>	2 µL	<i>Cryotop</i>	Temperatura ambiente	14%	Kásar et al., 2016
20% MeOH + 20% PG + 10% FBS	<i>Anguilla anguilla</i>	2 µL	<i>Cryotop</i>	Temperatura ambiente	5%	Kásar et al., 2016

Siglas: Albumina Sérica Bovia (BSA); Belltsville Thawing Solution (BTS); Dimetilsulfóxido (DMSO); Etilenoglicol (EG); Metanol (MeOH); Plasma Seminal (PS); Propilenoglicol (PG); Proteína Anticongelante de Peixe Tipo III (AFP III); Sacarose (Sac); Soro Fetal Bovino (BFS); Solução salina equilibrada de Hanks sem cálcio ajustado para 200 mOsm/Kg com água ultrapura (C-F HBSS); Trealose (Tre). * Viabilidade.

plasmática (até 98,4% e até 98,4%, respectivamente) e mitocondrial (até 36,2% e até 47,2%, respectivamente). Já Merino et al. (2011) vitrificaram sêmen de *O. mikiss* com 1% de BSA, também alcançando bons resultados de motilidade (até 82%), integridade de membrana plasmática (até 90%) e mitocondrial (até 54,7%).

Devido à complexidade de sua composição, o plasma seminal também pode ser incorporado ao meio de vitrificação como suplemento, pois ele pode reduzir os efeitos prejudiciais dos crioprotetores além de exercer atividade crioprotetora e antioxidante, uma vez que diversas substâncias com poder de remover radicais livres foram encontradas no sêmen de peixes (Figuroa et al., 2017). O plasma seminal já foi adicionado em diferentes concentrações (30%, 40% e 50%) à solução de vitrificação de *O. mikiss* (Figuroa et al., 2013), obtendo-se taxas de fertilização de 15,8%, 20,9% e 31,0%, respectivamente. As mesmas concentrações de plasma seminal foram testadas para a vitrificação de *S. salar* (Figuroa et al., 2015), obtendo-se taxas de fertilização de 27,1%, 34,4% e 46,2%, respectivamente.

Pesquisadores vêm testando vitrificação de sêmen sem uso de crioprotetor de ação interna, a fim de reduzir a hiperosmoticidade e a toxicidade (Figuroa et al., 2015; Asturiano et al., 2017). Contudo, para evitar a formação de cristais de gelo e o choque osmótico, é necessário que as taxa de congelamento e de reaquecimento sejam extremamente altas, e para isso a razão superfície/volume também precisa ser elevada, ou seja, a amostra deve ter volume muito baixo (Slabbert et al., 2015). Merino et al. (2011), sem adicionar nenhum crioprotetor, utilizando meio Cortland[®] adicionado de 1% BSA e 40% de plasma seminal, obteve taxas de motilidade e de integridade de membrana superiores a 80% e potencial de membrana mitocondrial de 55% em *O. mykiss*.

Pesquisas mais recentes vêm testando o uso de Proteínas Anticongelantes (PAC) em substituição aos crioprotetores para a vitrificação de sêmen de peixes (Abed-Elmdoust et al., 2015), uma vez que as PAC possuem capacidade de inibir a cristalização e a recristalização (Robles et al., 2006). A alta afinidade da proteína anticongelante de tipo III (PACIII) de se ligar ao núcleo dos cristais de gelo é devido à dupla característica de sua superfície de ligação (Yang e Sharp, 2004). No entanto, pesquisas que utilizaram proteínas anticongelantes para criopreservação de diferentes tipos de células tiveram resultados controversos, pois a eficácia das PAC é altamente dependente da dose utilizada (Rubinsky et al., 1992). Abed-Elmdoust et al. (2015) utilizaram diferentes volumes (0, 5, 10 e 15 μ L) de PACIII na vitrificação de sêmen de esurjão persa (*Acipenser persicus*), obtendo as melhores taxas de motilidade (16,41%) com 10 μ L de PACIII. O grande impasse de utilizar as PAC é seu alto custo no mercado, o que deixaria o processo de vitrificação mais oneroso.

Dispositivos para vitrificação de sêmen

Outro aspecto essencial para o sucesso da técnica é o uso do dispositivo adequado para armazenar o sêmen diluído antes da vitrificação, uma vez que devem permitir que as taxas de congelamento e reaquecimento sejam elevadas. Dessa forma, o ideal é que esses dispositivos sejam simples, fáceis de usar e tenham pequenos volumes para obter o estado vítreo (Xin et al., 2017). Dentre os principais dispositivos para vitrificação de sêmen temos: palheta francesa (método convencional), palheta fechada (CPS), palheta aberta (OPS), *cryoloop*, *cryotop* e o método de imersão direta a gota.

No método convencional, palhetas francesas de 0,25 mL são preenchidas com o sêmen devidamente diluído, seladas e imersas diretamente no nitrogênio líquido (Ali e Shelton, 1993). O principal benefício é que elas são seguras e fáceis de manipular, contudo, tem a desvantagem de necessitar de um certo tempo para o envase e a selagem, e de a razão superfície/volume ser relativamente baixa. Uma adaptação dessa técnica, a fim de reduzir o volume da amostra, é cortar ao meio, em forma de bisel, uma palheta de 0,25 mL (hemi-palheta), inserir o sêmen diluído e mergulhá-la em nitrogênio líquido. Em seguida, a hemi-palheta é colocada dentro de uma palheta de 0,50 mL para o armazenamento (Liebermann e Tucker, 2002). A técnica da hemi-palheta tem como vantagem o aumento da razão superfície/volume, o que eleva a taxa de resfriamento, além de reduzir os riscos de contaminação da amostra, durante a estocagem, ao acondicioná-la em uma palheta de volume maior. Contudo, o reaquecimento ocorre de forma mais lenta (Isachenko et al., 2005).

A palheta fechada (do inglês *Closed Pulled Straw* - CPS) consiste em uma palheta francesa que foi aquecida e alongada artesanalmente para reduzir seu diâmetro, facilitando a perda de calor (Chen et al., 2001). Após o envase, realizado por capilaridade, a CPS é selada nas extremidades e mergulhada diretamente no nitrogênio líquido. Já a palheta aberta (do inglês *Open Pulled Straw* - OPS) é fabricada de forma semelhante à CPS com a diferença de não haver a selagem das extremidades, permitindo que a amostra entre em contato direto com o nitrogênio líquido. Apesar de aumentarem a razão superfície/volume, ambos os dispositivos têm como desvantagem o tempo para o envase por capilaridade,



que é relativamente lento, principalmente devido à alta viscosidade da solução a ser vitrificada. Além disso, a OPS tem o risco de contaminação da amostra, devido ao contato direto com o nitrogênio.

O *cryoloop* é um instrumento constituído por uma alça de metal presa com um laço de nylon, normalmente confeccionado na tampa de um criotubo. A amostra a ser vitrificada é depositada sobre o laço, onde permanece fixa devido à tensão superficial, e, em seguida, é mergulhado no nitrogênio líquido. Após a congelação, o *cryoloop* é armazenado no criotubo (Carvalho et al., 2011). O dispositivo é de fácil manipulação, contudo, é limitado pelo pequeno volume e há risco de contaminação da amostra.

O *cryotop* consiste numa palheta de polipropileno conjugada a uma haste plástica e possui uma tampa plástica que recobre a estrutura (palheta-haste), impedindo o contato direto com o nitrogênio líquido, favorecendo uma melhor assepsia do material vitrificado (Kuwayama et al., 2005). Contudo, tem a desvantagem do baixo volume que pode ser acondicionado (apenas 2 µL) e do alto custo do material.

O método por imersão direta gota a gota consiste em depositar pequenas gotas do sêmen diluído diretamente sobre o nitrogênio líquido ou sobre uma superfície de metal previamente resfriada em nitrogênio. Durante a congelação, as gotas adotam uma forma esférica e são armazenadas em criotubos previamente resfriados em nitrogênio líquido. Essa técnica proporciona uma alta taxa de resfriamento, entretanto há risco de contaminação da amostra (Isachenko et al., 2007; Merino et al., 2012).

Vale ressaltar que, quando ocorre contato direto do sêmen com o nitrogênio líquido, há um grande risco de contaminação da amostra, podendo este ser um potencial transmissor de doenças infecciosas no processos de fertilização. Piasecka-Serafin (1972) demonstrou que 94% das amostras de sêmen bovino apresentaram contaminação após criopreservação em nitrogênio líquido previamente inoculado com *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, Bielanski et al. (2003) encontraram, em botijões de nitrogênio líquido oriundos de laboratórios de pesquisa, diversas espécies de bactérias, tanto ambientais quanto patogênicas, como a *Escherichia coli* e a *Stenotrophomonas maltophilia*, que demonstrou suprimir significativamente as taxas de fertilização e o desenvolvimento embrionário *in vitro* de bovinos.

A fim de evitar a contaminação cruzada, ou seja, a passagem de patógenos do botijão de nitrogênio para as amostras, recomenda-se utilizar uma baixa quantidade de nitrogênio líquido, em recipiente asséptico, para a ultracongelação e, em seguida, acondicionar as amostras em recipiente estéril pré-resfriado, vedando-o hermeticamente antes de armazená-lo em botijão criogênico (Bielanski et al., 2003). Outra alternativa é esterilizar o nitrogênio líquido com radiação ultravioleta (UV), técnica que se mostrou eficaz para eliminação de bactérias, vírus e fungos, sem que a radiação interferisse nas células e tecidos submetidos à vitriificação no nitrogênio esterilizado (Parmegiani et al., 2009, 2010, 2011). Dessa forma, é preciso avaliar as vantagens e desvantagens de cada dispositivo para escolher o mais apropriado para a vitriificação.

Considerações finais

A vitriificação de sêmen vem se tornando uma alternativa promissora para a conservação de gametas de peixe, por se tratar de um método simples, rápido e de baixo custo, que pode ser facilmente realizado, não necessitando de equipamentos sofisticados. Apesar dessa técnica vir apresentando resultados promissores, ainda há muito o que se definir para a elaboração de protocolos de vitriificação eficazes para sêmen de peixes, pois há uma grande variedade de soluções, dispositivos e taxas de reaquecimento utilizados para esta técnica. Além disso, vale ressaltar que o fator espécie-específico é bastante importante para a conservação do sêmen desse grupo de vertebrados.

Referências

- Abed-Elmdoust A, Farahmand H, Amiri BM, Rafiee G, Rahimi R.** Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquac Res*, v.46, p.2392-2397, 2015.
- Ali J, Shelton JN.** Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil*, v.98, n.2, p.459-465, 1993.
- Ali J, Shelton J.** Development of vitrification solutions. In: Tucker MJ, Liebermann J. *Vitrification in Assisted Reproduction: a user's manual and trouble-shooting guide*. London, UK: Informa Healthcare, p.45-63, 2007.
- Andreev A, Sadikova D, Gakhova E, Pashovkin T, Tikhomirov A.** Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. *Biophysics*, v.54, p.612-616, 2009.



- Asturiano J.F, Cabrita E, Horvath A.** Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen Comp Endocrinol*, v.245, p.69-76, 2017.
- Bagchi A, Woods EJ, Critser JK.** Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Rev Med Devices*, v.5, n.3, p.359-370, 2008.
- Bakhach J.** The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, v.5, n.3, p.119-126, 2009.
- Bielski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J.** Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, v.46, p. 146-152, 2003.
- Billard R, Zhang T.** Technique of genetic resources banking fish. In: Watson PF, Holt WV. *Cryobanking the Genetic resource: Wildlife Conservation for the Future*, Taylor & Francis, London, p.143-170, 2001.
- Blaxter JHS.** Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, v.172, p.1189-90, 1953.
- Carneiro PCF.** Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, n.3, p.361-366, 2007.
- Carvalho AA, Faustino RL, Figueiredo JR, Rodrigues Costa, APR.** Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Vet Bras*, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HS, Ho HN, Yang YS.** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod*, v.16, n.11, p.2350-2356, 2001.
- Cuevas-Urbe R, Chesney EJ, Daly J, Tiersch TR.** Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquac Res*, v.46, p.1770-1784, 2015.
- Figuroa E, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko E, Merino O, Isachenko, V, Valdebenito, I.** Sperm vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture*, v.372-375, p.119-126, 2013.
- Figuroa E, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Sanchez R, Effer B, Isachenko E, Farias JG, Valdebenito I.** Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, v.83, p.238-245, 2015.
- Figuroa E, Valdebenito I, Zepeda AB, Figuroa CA, Dumorne K, Castillo RL, Farias JG.** Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Rev Aquac*, v.9, p.76-87, 2017.
- Fuller BJ.** Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-lett*, v.25, p.375-388, 2004.
- Godinho H.P.** 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.
- Góes Filho LS.** Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de pós-graduação em Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. p.84, 2005.
- Gwo JC, Jamieson, BGM, Leung LKP.** Live preservation of fish gametes. In: Jamieson BGM. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)*. Enfield, NH, USA: Science Publishers, v.8B, p.395-484, 2009.
- Gwo JC.** Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Tiersch, TR, Green CC. *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd edn. World Aquaculture Society, Baton Rouge. Louisiana, 2011. p.459-481.
- Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Zueva V, Krivokharchenko I, Shafei R, Van Der Ven H.** Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum. Reprod*, v.20, n.2, p.492-496, 2005.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Sanchez R, Van Der Vem H, Nawroth F.** Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa. In: Tucker MJ, Liebermann J. *Vitrification in Assisted Reproduction: a user's manual and troubleshooting guide*. London, UK: Informa Healthcare, p.87-105, 2007
- Kása E, Bernath G, Kollar T, Zarski D, Lujic J, Marinovic Z, Bokor Z, Hegyi A, Urbanyi B, Vilchez MC, Morini M, Peñaranda DS, Pérez L, Asturiano JF, Horvath A.** Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla anguilla*). *Gen Comp Endocrinol*, v.245, p.102-107, 2016.
- Kopeika E, Kopeika J.** Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi SNH. (Ed.). *Fish Spermatology*. Alpha Science Inc, Oxford, p.465, 2008.



- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O.** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, v.11, n.5, p.608-614, 2005.
- Lewis SE, Sterling S, Young IS, Thompson W.** Comparison of individual antioxidants and total antioxidant capacity of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, v.67, p.142-147, 1997.
- Liebermann J, Tucker MJ.** Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, v.124, n.4, p.483-489, 2002.
- Liu Q, Li J, Zhang S, Ding F, Xu X, Zhizhong X.** An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red sea bream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. *J World Aquac Soc*, v.37, n.3, p.289-297, 2006.
- Luyet BJ, Hoddap A.** Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.39, p.433-434, 1938.
- Merino O, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko E, Figueroa E, Valdebenito I, Isachenko V.** Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim Reprod Sci*, v.124, p.125-131, 2011.
- Merino O, Sánchez R, Risopatrón J, Isachenko E, Katkov II, Figueroa E, Valdebenito I, Mallmann P, Isachenko V.** Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. *Andrologia*, v.44, p.390-395, 2012.
- Naik BR, Rao BS, Vagdevi R, Gnanprakash M, Amarnath D, Rao VH.** Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci*, v.86, n.3-4, p.329-338, 2005.
- Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M.** Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil. Steril*, v. 94, p.1525-1528, 2010.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M.** Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online*, v.23, n.4, p.505-512, 2011.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Filicori M.** Ultra-violet sterilization of liquid nitrogen prior to vitrification. *Hum. Reprod*, v.24, n.11, p.2969, 2009.
- Piasecka-Serafin M.** The effect of the sediment accumulated in containers under experimental conditions on the infection of semen stored directly in liquid nitrogen (-196 °C). *Bull Acad Pol Sci Biol*, v.20, n.4, p.263-267, 1972.
- Quinn P.** Suppression of ice in aqueous solutions and its application to vitrification in assisted reproductive technology. In: Chian RC, Quinn P. *Fertility cryopreservation*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p.10-15, 2010.
- Robles V, Cabrita E, Anel L, Herraes MP.** Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: toxicity and protein distribution. *Aquaculture*, v.261, p.1299-1306, 2006.
- Rubinsky B.** Principles of Low Temperature Cell Preservation, *Heart Fail Rev*, v.8, n.3, p.277-284, 2003.
- Rubinsky B, Arav A, Devries AL.** The cryo-protective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology*, v.29, p.69-79, 1992.
- 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.
- Slabbert M, Du Plessis, SS, Huyser C.** Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, v.47, p.594-599, 2015.
- Varela-Junior A, Goularte KL, Alves JP, Pereira FA, Silva EF, Cardoso TF, Jardim RD, Streit Jr DP, Corcini CD.** Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Anim Reprod Sci*, v.157, p.71-77, 2015.
- Vasconcelos ACN.** Criopreservação e vitriificação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): uso de diferentes crioprotetores na solução diluidora. *Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras*. p.76, 2014.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.



Xin M, Siddique MAM, Dzyuba B, Cuervas-Uribe R, Shaliutina-Kolesova A, Linhart O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: a mini review. *Theriogenology*, v.98, p.16-22, 2017.

Yang CH, Sharp KA. The mechanism of the type III antifreeze protein action: a computational study. *Biophys Chem*, v.109, p.137–148, 2004.
