



Avanços na conservação de sêmen de peixes brasileiros: novas abordagens e tecnologias

Advances in the conservation of brazilian fish semen: new approaches and technologies

Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley¹, João Eudes Farias Cavalcante-Filho¹, Jessica Sales Lobato¹, Renata Vieira do Nascimento¹

¹Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, Ceará, Brasil

Resumo

Nos últimos anos, a piscicultura no Brasil tem se expandido significativamente, com destaque para a produção de tilápias, posicionando o país como o quarto maior produtor mundial. A criação de espécies nativas também avançou, mas sua reprodução natural é influenciada pela piracema, tornando necessária a indução hormonal em cativeiro. O extrato hipofisário de carpa (EHC) é amplamente utilizado, porém análogos sintéticos de GnRH vêm demonstrando bons resultados. A manipulação dos gametas permite a obtenção de larvas e a preservação genética, exigindo técnicas de conservação como resfriamento, congelamento e vitrificação para manter a viabilidade espermática. A criopreservação, que utiliza nitrogênio líquido (-196°C), é essencial para a conservação genética e requer diluentes como glicose e crioprotetores como DMSO. Já a vitrificação é um método rápido que necessita de altas concentrações de crioprotetores, enquanto o resfriamento é uma alternativa simples e de baixo custo. Além disso, diluidores, crioprotetores e antioxidantes são empregados para minimizar danos celulares. Esta revisão aborda os avanços nas técnicas de conservação seminal de peixes brasileiros, destacando os principais métodos, estratégias de suplementação e perspectivas para otimização das técnicas existentes.

Palavras-chave: Biotecnologia reprodutiva, Armazenamento seminal, Piscicultura.

Abstract

In recent years, aquaculture in Brazil has significantly expanded, with a particular emphasis on tilapia production, positioning the country as the fourth-largest producer worldwide. The farming of native species has also progressed; however, their natural reproduction is influenced by piracema, making hormonal induction in captivity necessary. Carp pituitary extract (EHC) is widely used, but synthetic GnRH analogs have shown promising results. Gamete manipulation enables larvae production and genetic preservation, requiring conservation techniques such as cooling, cryopreservation, and vitrification to maintain sperm viability. Cryopreservation, which involves liquid nitrogen (-196°C), is essential for genetic conservation and requires diluents such as glucose and cryoprotectants like DMSO. Meanwhile, vitrification is a rapid method that demands high concentrations of cryoprotectants, whereas cooling serves as a simple and low-cost alternative. Additionally, diluents, cryoprotectants, and antioxidants are used to reduce cellular damage. This review explores advances in fish semen conservation techniques in Brazil, highlighting the main conservation methods, supplementation strategies, and prospects for optimizing existing techniques.

Keywords: Reproductive biotechnology, Semen storage, Aquaculture.

Introdução

Nos últimos anos, a criação de peixes tem crescido significativamente em diversas regiões do Brasil (Peixe BR, 2023). O país ocupa, atualmente, a quarta posição no *ranking* mundial de produção de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma espécie exótica amplamente cultivada devido à sua rápida taxa de crescimento, rusticidade e alta aceitação no mercado consumidor (KHAW; PONZONI; DANTING, 2008). Além disso, no Brasil, a piscicultura de espécies nativas também apresentou crescimento expressivo em 2022, consolidando-se como um setor em expansão em relação aos anos anteriores (Peixe BR, 2023).

A reprodução natural das espécies nativas é influenciada pela piracema, que é um período no qual os peixes migram para os ambientes de reprodução (VENTUERI e BERNARDINO, 1999). Contudo, em

cativeiro, os peixes nativos não se reproduzem naturalmente e precisam ser induzidos a reprodução (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007). Um indutor amplamente utilizado é o extrato hipofisário de carpa (EHC) e que apresenta resultados satisfatórios para espécies nativas, como *Colossoma macropomum* e *Prochilodus brevis* (ALMEIDA-MONTEIRO et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021). Outros indutores vêm sendo testados e apresentaram resultados promissores para *P. brevis* e outras espécies, como análogos do GnRH (KONZEN-FREITAS et al., 2020; VIEIRA et al., 2023).

A indução hormonal possibilita a manipulação dos gametas, viabilizando a obtenção de larvas. No entanto, em fazendas de piscicultura, pode haver interesse na troca de material genético ou preservação de reprodutores, sendo a manipulação dos gametas uma alternativa (GODINHO, 2007). Dessa forma, técnicas de criopreservação (resfriamento, congelamento e vitrificação) podem ser empregadas para prolongar a viabilidade espermática e garantir sua utilização (NASCIMENTO et al., 2017; ALMEIDA-MONTEIRO et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021; SALES et al., 2023). Contudo, os espermatozoides são sensíveis ao ambiente externo, sendo necessária a utilização de um diluidor, que vai manter a viabilidade celular e possibilitar sua utilização em um momento oportuno (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

Diante da crescente demanda por técnicas eficientes de conservação seminal, a utilização de meios de conservação alternativos vem sendo desenvolvidos com a finalidade de reduzir os danos celulares causados pelas baixas temperaturas (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012). Dentre os métodos já utilizados, destacam-se o resfriamento, a congelamento e a vitrificação, sendo amplamente aplicados para espécies como *C. macropomum*, *P. brevis* e *Piaractus mesopotamicus* (CONTRERAS et al., 2020; SHAZADA et al., 2023; SUQUET et al., 1999). Para aprimorar esses processos, diferentes meios diluidores têm sido testados, incluindo soluções à base de glicose 5%, ACP-104 e Beltsville Thawing Solution (BTS), cada um com diferentes níveis de eficácia dependendo da espécie e do método empregado (MEDINA, 2008; TEODOZIA et al., 2020; VARELA-JR et al., 2015).

Além disso, é possível suplementar o meio de conservação e melhorar a viabilidade e manutenção das células espermáticas, podendo serem utilizadas substâncias de caráter antioxidante ou protetores de membrana plasmática (SALMITO-VANDERLEY; ALMEIDA-MONTEIRO; NASCIMENTO, 2016). Entre os antioxidantes já testados, destacam-se a taurina, a cisteína e a melatonina, que demonstraram potencial para reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo e melhorar a motilidade espermática em espécies como *C. macropomum* e *P. brevis* (CABRITA et al., 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2013; TORRES et al., 2022). Além disso, os polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de macroalgas, como *Soliera filiformis* e *Gracilaria domingensis*, têm se mostrado promissores na manutenção da integridade estrutural e na melhora dos parâmetros espermáticos (PEREIRA et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2022).

Diante desse cenário, este artigo de revisão tem como objetivo analisar os avanços nas técnicas de conservação seminal de peixes brasileiros, destacando os principais meios de conservação, as estratégias de suplementação e as perspectivas para otimização das técnicas existentes, visando contribuir para o aprimoramento das biotecnologias reprodutivas.

Biologia reprodutiva

A respeito da reprodução dos peixes brasileiros, uma parte dessas espécies realiza migração com a finalidade de se reproduzir, evento conhecido como piracema. Esse processo se caracteriza pela migração dos animais por vários quilômetros até chegarem às cabeceiras dos rios, que é o local de desova (GURGEL; VERANI; CHELLAPA, 2012). Assim como em outros grupos animais, a maturação das células gaméticas em peixes é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Fatores externos, como ambientais e químicos, ativam o hipotálamo, que, por sua vez, secreta hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH). Esses hormônios estimulam a hipófise a produzir e liberar gonadotrofinas (GtH), que atuam diretamente sobre as gônadas, promovendo a produção, maturação e liberação dos gametas (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

Quando mantidos em cativeiro, os peixes migratórios não são capazes de maturar a gônada de forma natural, fator que inibe a desova e a reprodução. Nas fêmeas, o desenvolvimento final do ovócito é interrompido, pois a vitelogenese é cessada e, nos machos, o volume seminal é muito pequeno, embora a espermatogênese seja realizada completamente (GARCIA, 2012; ZOHAR e MYLONAS, 2001). Assim, é imprescindível o uso de hormônios indutores da desova, como: o extrato hipofisário de peixes e os análogos de hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRHs).

O extrato hipofisário de peixes é o indutor hormonal mais utilizado para a reprodução em cativeiro (SEVIGNANI; BUZZACARO; FORTUNA, 2020). A obtenção ocorre por meio da retirada da hipófise (hipofisectomia) de peixes como tilápia, salmão, carpa e palometas, entre outras. Para que esse processo

seja eficaz, é essencial que os indivíduos estejam sexualmente maduros (BALDISSEROTO, 2018). Embora as induções hormonais sejam amplamente utilizadas, traz consigo desvantagens como a falta de controle da concentração de outros hormônios, como Prolactina (PRL), Hormônio Estimulador da Tireoide (TSH), Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) e Hormônio do Crescimento (GH). Além da falta de padronização ocasionada pela falta de padronização de hormônios contidos na glândula, também há possibilidade de reação imunológica e transmissão de doenças ao peixe receptor e falta de estímulos a outros hormônios reprodutivos (EVANS e CLAIBORNE, 2006; HOAR et al, 1983; MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010; MYLONAS; DUNCAN; ASTURIANO, 2017).

No que se refere a utilização de EHC, a resposta a aplicação varia conforme a espécie e as condições fisiológicas dos reprodutores. Nas fêmeas, a literatura indica duas aplicações para induzir a ovulação com sucesso, enquanto nos machos, uma única dose geralmente é suficiente para estimular a liberação do sêmen (Woynarovich e Horvath, 1983). O protocolo utilizado envolve a administração de hipófise na dosagem de 0,5 mg a 5,0 mg por quilograma de peso corporal. Contudo, é importante destacar que a sensibilidade ao hormônio pode variar entre espécies, o que acaba por exigir que sejam desenvolvidos protocolos de indução. Por exemplo, espécies de lambaris como *Astyanax bimaculatus* e *Tetragonopterus chalcus*, responderam satisfatoriamente a uma única aplicação de EHC na dose de 6,0 mg/kg (SATO et al., 2006). Por outro lado, fêmeas de lambari (*Deuterodon iguape*) apresentaram maior taxa de desova quando submetidas a duas aplicações de extrato hipofisário de carpa (EHC) (Lopes; Silva; Henrique, 2014). Para outras espécies reofílicas, como *P. brevis*, EHC já se demonstrou eficaz com indução em duas doses para fêmeas e uma única dose para machos (NUNES et al., 2019).

Para driblar as desvantagens do EHC, novos indutores reprodutivos vêm sendo testados, como análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Esses hormônios atuam diretamente no topo do eixo reprodutivo, especificamente sobre a hipófise, e sinteticamente pode ser acrescido de um antagonista de dopamina, possibilitando maior sucesso reprodutivo (PETER; LIN; VAN DER KRAAK, 1988). O análogo de GnRH de salmão (GnRHs) associado à domperidona é um indutor sintético eficiente e de baixo custo, amplamente utilizado na reprodução de Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes (GONÇALVES, 2013). Este indutor tem a dose padrão de 0,5 mL/kg e já foi testado para *Prochilodus lineatus*, com machos respondendo a 0,25 mL/kg e fêmeas a duas doses de 0,5 + 0,45 mL/kg (HILL et al., 2009; GONÇALVES, 2013).

Métodos de conservação

A conservação do sêmen de peixes é uma ferramenta essencial para a reprodução assistida, sendo amplamente utilizada em programas de aquicultura e conservação da diversidade biológica. As técnicas de armazenamento do sêmen permitem sua utilização em momentos oportunos, otimizando a gestão reprodutiva e preservando a diversidade genética (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012). Os principais métodos incluem o resfriamento, criopreservação e vitrificação, cada um com características e aplicações específicas.

Para a maioria dos métodos de conservação seminal, é necessário diluir o sêmen em um meio adequado, composto por um diluente e por um crioprotetor, com a finalidade de manter a viabilidade espermática e prevenir crioinjúrias (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012). Os diluentes são soluções ricas em sais e/ou carboidratos, que aumentam o volume seminal, facilitando a distribuição em doses e fornecendo energia aos espermatozoides. Para ser considerado adequado, um diluente deve ter as seguintes características: isotonicidade, para que não haja ativação 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, ou seja, não devem vincular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas; e, finalmente, servir de carreador de crioprotetores (LEGENDRE e BILLARD, 1980). Um dos diluentes mais utilizados na conservação seminal é a glicose, devido à sua capacidade de fornecer energia e atuar como estabilizador osmótico (ALMEIDA-MONTEIRO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021).

Os crioprotetores são substâncias essenciais para proteger as células espermáticas contra os efeitos deletérios da congelamento, reduzindo os danos causados pela formação de cristais de gelo e pelo estresse osmótico (BATISTA et al., 2006). Esses podem ser classificados como intracelulares (permeáveis) ou extracelulares (impermeáveis). Os crioprotetores intracelulares atravessam a membrana celular e evitam a formação de cristais de gelo intracelulares, desidratando a célula e reduzindo seu ponto crioscópico. Os extracelulares protegem a célula externamente, estabilizando a membrana e reduzindo os efeitos do congelamento (WATSON, 1995). Entre os crioprotetores mais utilizados na congelamento do sêmen de peixes

podem ser citados os crioprotetores internos como o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol, normalmente em concentrações de 5% a 15% (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

A necessidade de utilizar diluentes e crioprotetores varia conforme o método de conservação empregado. O resfriamento seminal pode ser realizado com ou sem o uso de diluentes, mas a literatura recomenda sua utilização devido ao aumento do volume seminal e à melhor nutrição das células espermáticas (CAROLSFELD e HARVEY, 1999). O uso de crioprotetores não é necessário nesse método, uma vez que este não é recomendado a exposição prolongada dos espermatozoides nessa solução devido a sua alta toxicidade (OLIVEIRA, 2012). Por outro lado, na congelação e vitrificação, o uso do meio diluidor (diluyente e crioprotetor) é indispensável para preservar a viabilidade dos espermatozoides e garantir melhores taxas de motilidade espermática pós-descongelação (ALMEIDA-MONTEIRO et al., 2020).

Resfriamento seminal

O resfriamento seminal é uma técnica de preservação de espermatozoides que permite o seu armazenamento temporário. Esse método envolve a conservação das amostras seminais sem exposição à luz, com temperaturas variando entre 0 e 4 °C, em um ambiente com oxigênio, por um período que pode variar de algumas horas a dias (CONTRERAS et al., 2020; SHALIUTINA et al., 2013). Trata-se de um método eficaz, de fácil execução, baixo custo e com menor risco de danos aos espermatozoides, pois procede com temperaturas de armazenamento mais altas e dentro da faixa que as células conseguem tolerar em relação ao frio (CONTRERAS et al., 2020; PIRES et al., 2019).

Esta é uma ferramenta voltada para o aprimoramento das estratégias reprodutivas, com o objetivo de preservar a viabilidade dos espermatozoides e sua capacidade de fertilizar (CONTRERAS et al., 2020). Entre as principais vantagens dessa técnica, destacam-se: a oferta controlada e contínua de gametas, permitindo seu uso no momento mais oportuno para a reprodução e resolvendo o problema da dessincronia reprodutiva entre machos e fêmeas; a eliminação da necessidade de manter ou transportar reprodutores permanentes para fertilização artificial; a realização de pesquisas sobre a preservação do patrimônio genético para programas de hibridização e seleção genética; e a facilidade de intercâmbio entre instituições de pesquisa e pisciculturas (CONTRERAS et al., 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2009; PIRES et al., 2019; SHAZADA et al., 2023). No entanto, alguns fatores podem influenciar negativamente a qualidade e a viabilidade dos espermatozoides, como a temperatura de armazenamento, a exposição à luz, a atmosfera ao redor, e o uso de antibióticos e diluentes (CONTRERAS et al., 2020; SHAZADA et al., 2023).

Ravinder et al. (1997) avaliaram a conservação do sêmen de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e observaram que os espermatozoides paravam de se movimentar entre 20 e 84 h de resfriamento, em diferentes temperaturas. Na temperatura de 22°C, após 20 h de resfriamento foi identificado perda de motilidade, enquanto a 2°C os espermatozoides pararam após 84 h de resfriamento. Contudo, quando mantidos a 5°C, foi possível observar uma motilidade de 33% após 84h, evidenciando que temperaturas mais baixas favorecem a preservação espermática. Resultados semelhantes foram encontrados por Scott e Baynes (1980) ao avaliarem o sêmen de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). O armazenamento a 12°C permitiu a manutenção da capacidade fecundante por menos de 24 horas, enquanto temperaturas entre 0 e 5°C possibilitaram a fertilização por até oito dias.

No caso de peixes neotropicais, Viveiros et al. (2014) relataram que o sêmen não diluído de *P. lineatus*, quando refrigerado entre 6 e 8°C, permaneceu viável por até dois dias. Diante das limitações do resfriamento do sêmen não diluído, estudos passaram a investigar o uso de diluentes para prolongar sua viabilidade. A glicose tem sido amplamente utilizada nesse contexto, demonstrando efeitos positivos na manutenção da motilidade espermática. Orfão et al. (2010) observaram que o sêmen de *P. lineatus*, quando diluído em glicose, manteve 26% de motilidade espermática após quatro dias de resfriamento. Da mesma forma, Oliveira (2006) relatou que o sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*), quando resfriado no mesmo diluyente, apresentou motilidade média de 30% após 48 horas. Por outro lado, para *P. brevis*, a glicose não se mostrou um diluyente ideal para o resfriamento, pois os espermatozoides apresentaram motilidade até 24 h de resfriamento. Após esse período, as amostras diluídas ACP-104 apresentaram taxas de motilidade espermáticas superiores (NASCIMENTO et al., 2017). Oliveira (2012) e Garcia et al. (2016) também obtiveram resultados satisfatórios no resfriamento seminal de *C. macropomum* com ACP-104.

Dessa forma, a literatura demonstra que o uso de temperaturas mais baixas e a adição de diluentes específicos são estratégias essenciais para aumentar a longevidade espermática no resfriamento seminal, possibilitando maior flexibilidade no manejo reprodutivo de diferentes espécies aquícolas.

Congelação seminal

A técnica de congelação tem como característica conservar os gametas em nitrogênio líquido (-196 °C), por tempo indeterminado, mantendo a sua morfologia viável e funcional (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014). A presente técnica tem como benefícios o fornecimento de subsídios para o desenvolvimento de bancos de germoplasma na busca de garantir a diversidade e a preservação do material genético de espécies. Tem sido um método amplamente utilizado para diferentes grupos animais, sendo para peixes uma boa alternativa para melhorar sua reprodução em cativeiro, tendo em vista que é possível melhorar a: sincronização na disponibilidade de sêmen, facilidade no transporte, retardo no envelhecimento dos gametas, conservação da variabilidade genética e eliminação dos custos com a manutenção dos machos (SUQUET et al., 1999).

Para que a congelação seminal seja um sucesso, é importante que o sêmen esteja diluído em um meio diluidor, que é composto por um diluente e um crioprotetor, com função de proteger as células contra a ação do frio (PICKETT; SQUIRES; MACKINNON, 1987; SALMITO-VANDERLEY et al., 2014). O processo inicia-se com a coleta e diluição do sêmen, seguida pelo envasamento em palhetas ou criotubos e posterior diminuição da temperatura até o armazenamento em nitrogênio líquido. Para a congelação, são utilizados equipamentos como rampas de congelação, botijões de vapor de nitrogênio (*dry shipper*) e freezers programados (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

A combinação da diluente glicose 5% e do crioprotetor interno dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % é amplamente utilizada na congelação de sêmen de diversas espécies de peixes. Essa associação tem sido aplicada com sucesso em espécies como a pirapitinga (*Piaractus brachipomus*), tambaqui (*C. macropomum*) e curimatã comum (*P. brevis*) (MEDINA, 2008; CAROLSFELD et al, 2003; NUNES et al., 2016; ALMEIDA-MONTEIRO et al., 2017). Esta solução diluidora também pode ser acrescida de um crioprotetor externo, como a gema de ovo 10%, que já foi testada e apresentou bons resultados para as espécies brasileiras *Brycon orbignyanus*, *P. lineatus*, *P. mesopotamicus*, *S. maxillosus*, *Leporinus elongatus* e *Pseudoplatystoma corruscans* (CAROLSFELD et al, 2003; TEODOZIA et al., 2020). Embora a gema de ovo tenha se mostrado uma boa opção, sabe-se que seu uso pode ocasionar contaminação e diminuir a capacidade fecundante dos espermatozoides e, por isso, tem-se usado lipoproteínas de origem vegetal, como a lecitina de soja, que já foi usado para bovinos e espécies de peixes, como *C. macropomum* e *P. brevis* (BOUSSEAU et al., 1998; LOPES, 2019; TORRES et al., 2022).

Outro diluente interessante para a criopreservação é a água de coco em pó (ACP®), que é utilizada para diferentes animais, inclusive peixes. Melo-Maciel et al. (2015) relatam em seus estudos resultados satisfatórios quando o sêmen de tambaqui foi congelado em ACP-104 associado a DMSO 10%. Por outro lado, Teodozia et al., (2020) relatam que para a congelação seminal de *P. mesopotamicus*, o uso deste mesmo diluidor não é tão eficiente quanto a glicose 5% e DMSO 10%. Contudo, Nascimento et al. (2017) relatam que, após diferentes períodos de resfriamento (etapa estabilização/tempo de equilíbrio do sêmen antes da congelação), a associação de ACP-104 e DMSO mostra-se mais eficiente do que glicose 5% e DMSO 10%. Esses resultados demonstram a importância de avaliar diferentes meios de diluição para cada espécie, considerando suas particularidades fisiológicas e reprodutivas.

Para aprimorar os meios de criopreservação, estudos têm explorado a suplementação com crioprotetores extracelulares e/ou agentes antioxidantes, visando minimizar danos celulares e preservar a funcionalidade espermática. Alguns agentes antioxidantes têm sido utilizados para diminuir os danos ocasionados pelas baixas temperaturas, como: taurina, cisteína e melatonina. A taurina apresenta ação antioxidante e já foi utilizada com sucesso para a congelação seminal de diferentes espécies, inclusive *C. macropomum* e *P. brevis* (CABRITA et al., 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2013; LOPES et al., 2018; Torres et al., 2022). Por outro lado, o antioxidante cisteína apresentou resultados variáveis, sendo eficaz para *C. carpio* e *Perca fluviatilis*, mas com desempenho adverso em outras espécies (SAROSIEK et al., 2014; ÖGRET MEN et al., 2015). A melatonina, outra substância com ação antioxidante, tem demonstrado alto potencial na melhora dos parâmetros cinéticos dos espermatozoides de *P. lineatus*, *B. orbignyanus* e *P. brevis* (PALHARES et al., 2020, 2021; MOTTA et al., 2022; TORRES et al., 2024). Esses dados reforçam a importância da avaliação individualizada dos antioxidantes, considerando as particularidades fisiológicas de cada espécie na criopreservação seminal.

Os polissacarídeos sulfatados (PS), provenientes de fontes animais ou macroalgas, têm sido investigados como potenciais suplementos devido às suas propriedades antioxidantes e capacidade de interação com proteínas de membrana, formando proteoglicanos (Jridi et al., 2019; Mourão & Pereira, 1999). Esses compostos desempenham papéis importantes na regulação da sinalização celular e ajudam a manter a pressão osmótica, devido à sua alta capacidade de retenção de água (Iozzo & Schaefer, 2015). Os primeiros estudos sobre a suplementação do meio diluidor com polissacarídeos foram realizados em mamíferos, utilizando glicosaminoglicanos não sulfatados, como o ácido hialurônico. Os resultados

indicaram que sua eficácia pode variar, sendo eficaz na congelação do sêmen de javalis, mas ineficiente no sêmen de carneiros (QIAN; YU; ZHOU, 2016; NAJAFI et al., 2014).

Na congelação seminal de peixes, os polissacarídeos sulfatados vêm sendo utilizados na suplementação do meio diluidor e tem apresentado resultados promissores. Pereira et al. (2020) demonstraram que os PS extraídos da macroalga vermelha *S. filiformis*, quando adicionado ao meio ACP-104 e DMSO 10%, auxiliaram na manutenção da morfologia espermática do tambaqui (*C. macropomum*). Além disso, os PS extraídos da pele de tilápia do Nilo melhoraram a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, com resultados superiores aos do grupo controle. Em outro estudo, envolvendo o uso de PS no meio diluidor seminal (glicose e DMSO 10%) de *P. brevis*, percebeu-se que outra macroalga vermelha, no caso *G. domingensis*, apresentou resultados promissores, uma vez que esse tratamento teve motilidade progressiva superior ao grupo controle (Nascimento et al., 2022). No entanto, quando essa mesma alga foi aplicada ao resfriamento seminal, não foram observadas melhorias nem prejuízos nos parâmetros espermáticos (Sales et al., 2023). De maneira semelhante, Nascimento et al. (2021), Pereira et al. (2022) e Lobato et al. (2022) testaram diferentes polissacarídeos sulfatados na congelação do sêmen de curimatã comum e de tambaqui e concluíram que concentrações mais elevadas de PS são prejudiciais, enquanto concentrações mais baixas são as mais indicadas.

Vitrificação

A vitrificação é uma outra forma de preservar as células gaméticas por imersão direta em nitrogênio líquido, sendo reconhecida por sua simplicidade, baixo custo e rapidez (FIGUEROA et al., 2015). Devido a rapidez no qual a amostra deve atingir o estado vítreo durante a vitrificação, deve-se utilizar concentrações elevadas de crioprotetores, a fim de aumentar a viscosidade da solução, e congelar a amostra em pequenos volumes de forma rápida e em temperaturas muito baixas (ALI e SHELTON, 1993; CHIAN et al., 2004; LUYET e HODDAP, 1938; RUBINSKY, 2003).

Embora apresente vantagens, essa técnica coloca os espermatozoides em condições fisiológicas desfavoráveis, o que pode causar danos celulares devido ao choque térmico e osmótico, estresse oxidativo e alterações no plasma seminal, resultando em uma diminuição na qualidade espermática (WATSON, 1995). Para preservar os espermatozoides em baixas temperaturas, se faz necessário adotar um protocolo adequado, levando em consideração a qualidade e a quantidade do diluente, o tipo e a concentração dos crioprotetores, o volume da amostra e as características das células (KOPEIKA e KOPEIKA, 2008).

O processo de vitrificação requer o uso de grandes volumes de crioprotetores, o que pode ser tóxico para as células, sendo necessário adotar precauções para garantir o sucesso da técnica. Entre essas medidas, destacam-se a minimização do volume da solução de vitrificação para aumentar as taxas de congelação e reaquecimento, além do uso de dispositivos adequados para o envase, uma vez que os principais fatores para uma vitrificação bem-sucedida envolvem a prevenção da cristalização intracelular e a toxicidade (XIN et al., 2017).

No que se refere aos diluentes utilizados, a glicose é o diluente mais utilizado na congelação convencional. Contudo, diluentes mais complexos são mais comumente utilizados para vitrificação de sêmen de peixes, como o BTS (Varela-Jr et al., 2015), meio Cortland® (Merino et al., 2011; Figueroa et al., 2013), 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).

Para espécies *P. lineatus*, Vasconcelos (2014) relatou taxa de motilidade de 0% utilizando meio BTA e MeOH 10%. Varela Jr et al. (2015), para tambaqui, também relatou a mesma taxa com meio contendo BTS e DMSO. 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). Cuevas-Urbe et al., 2015 relatam boas taxas de modilidade pós descongelação para vitrificar sêmen de truta marrom (*Salmo trutta trutta*) e de duas espécies de cioba (*Lutjanus campechanus* e *Rachycentron canadum*). Em um estudo recente, Almeida-Monteiro et al. (2020) sugerem para a vitrificação de *P. brevis* é sugerido a associação de ACP® e etilenoglicol.

Aplicação e perspectiva

O desenvolvimento e o aprimoramento das biotécnicas voltadas para a conservação de sêmen de peixes tem se tornado uma alternativa promissora. Apesar das técnicas apresentarem resultados



promissores, ainda se faz necessário a elaboração de protocolos de resfriamento, congelamento e vitrificação eficazes para sêmen de peixes, pois há uma grande variedade de soluções, dispositivos e taxas de reaquecimento utilizados para as técnicas citadas. Além disso, vale ressaltar que o fator espécie-específico é bastante importante para a conservação do sêmen desse grupo de vertebrados.

Dessa forma, a presente revisão direciona as pesquisas futuras relacionadas à conservação de sêmen de peixes brasileiros, pontuando as biotécnicas, as espécies, seus principais instrumentos e meios utilizados, ressaltando a interação do diluidor com o espermatozoide é espécie-específico, uma vez que um determinado diluidor é eficaz na congelamento do sêmen de uma espécie, no entanto em outra não apresenta a mesma qualidade seminal pós-descongelamento.

Consequentemente, pode-se melhorar os protocolos encontrados para cada espécie, sendo necessário a realização de métodos de avaliação da qualidade seminal, na perspectiva de obter boas taxas de fertilização, favorecer a conservação e a produção em larga escala. Além de continuar promovendo a melhora no pós-descongelamento do sêmen de diferentes espécies de peixes, otimizando assim a prática de reprodução artificial desta e outras espécies nas estações de piscicultura.

Considerações finais

A conservação de sêmen permite a reprodução em cativeiro de espécies de peixes reofílicos e ameaçadas de extinção, além de reduzir os custos com reprodutores para os piscicultores. Apesar dos avanços nas técnicas, que mostram sua importância como uma ferramenta essencial para a implementação e flexibilidade nos programas de reprodução, ainda é necessário melhorar as soluções diluidoras. A inclusão de substâncias antioxidantes nos meios de conservação tem apresentado resultados promissores, ainda são necessárias pesquisas para criar diluentes adequados a cada espécie, com o objetivo de garantir a melhor qualidade espermática e, consequentemente, altas taxas de fertilização.

Vale ressaltar que, além dos meios de congelamento, diversos outros fatores influenciam a qualidade do sêmen criopreservado, como a taxa de resfriamento, a concentração espermática, o tempo e o método de adição dos crioprotetores, os métodos de envase, as condições de congelamento, o tempo de descongelamento, o método de análise da motilidade, entre outros. Cada um desses aspectos pode impactar os resultados de maneira distinta, dependendo da espécie de origem do sêmen. Por isso, é crucial incentivar estudos sobre a caracterização do sêmen de peixes, a fim de padronizar as biotecnologias voltadas para sua conservação.

Agradecimentos

Agradecemos ao Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa, à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

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.
- Almeida-Monteiro PS, Oliveira-Araújo MS, Pinheiro RRR, Lopes JT, Ferreira YM, Montenegro AR, Melo-Maciel MAP, Salmito-Vanderley CSB.** Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). *Semina: Ciências Agrárias* 38(4):2669-2680, 2017.
- Almeida-monteiro PS, Pinheiro RRR, Oliveira-Araújo MS, Sales YS, Nascimento RV, Nunes LT, ... Salmito-Vanderley CSB.** Sperm vitrification of *Prochilodus brevis* using Powder Coconut Water (ACP-104) in association with different cryoprotectant concentrations. *Aquaculture Research*, v. 51, n. 11, p. 4565-4574, 2020.
- Anuário Brasileiro da Piscicultura, PEIXE BR.** São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura. 2023. 65 p.
- Ali J, Shelton JN.** Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal Reproduction Fertility*, 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.
- Baldisseroto, B.** Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3. Edição: Santa Maria: UFSM, 2018.
- 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.
- 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. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 423-428, 2006.
- Cabrita EMAS, 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. *Animal Reproduction Science*, v. 125, p. 189- 195, 2011.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ.** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.
- Carolsfeld J, Harvey BJ.** Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust. *Curso de treinamento brasileiro*. 47 p, 1999.
- Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T.** High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *Journal Reproduction Development*, v. 50, n. 6, p. 685-696, 2004.
- Contreras P, Ulloa P, Merino O, Valdebenito I, Figueroa E, Farías J, Risopatrón J.** Effect of short-term storage on sperm function in Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) sperm. *Aquaculture*, v. 481, p. 58-63, 2017.
- Contreras P, Dumorné K, Ulloa-Rodríguez P, Merino O, Figueroa E, Farias JG, Risopatron J.** Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 3, p. 1373-1389, 2020.
- Cuevas-Uribe R, Chesney EJ, Daly J, Tiersch TR.** Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture Research*, 46, 1770-1784. 2015.
- Evans D, Claiborne JB.** The physiology of fishes. Boca Raton, FLA. Taylor & Francis Group; 616 p. 2006.
- Figueroa 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.
- Figueroa E, Merino O, Risopatron 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.
- Garcia CEO.** Perfil dos esteroides gonadais e expressão dos hormônios foliculo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) durante a inversão sexual de *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), hermafrodita protogínico, utilizando-se inibidor de aromatase. 2012. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- Garcia RRF, Vasconcelos ACN, Povh JN, Oberst ER, Eloy LR, Streit-Junior DP.** Different extenders solutions for tambaqui semen cooling. *Pesq. agropec. Bras.*; vol.51 n.6, 2016.
- Godinho HP.** Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31.3: 351-360. 2007.
- Gonçalves ACS.** Osmolaridade na motilidade espermática de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*, e GnRH_a e anti-dopamina na indução da espermiacão e desova de *Prochilodus lineatus*. 2013. 99 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós- Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2013.
- Gurgel LDL, Verani, JR, Chellappa S.** Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-7, 2012.
- Hill JE, Hilgore KH, Pouder DB, Powell JFF, Watson CA, Yanog RPE.** Survey of ovaprim use as a spawning aid in ornamental fishes in the United States as administered through the University of Florida Tropical Aquaculture Laboratory. *North American Journal of Aquaculture*, v. 71, n. 3, p. 206-209, 2009.
- Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM.** Fish physiology. Vancouver, CA: Academic Press: 1983. 476 p.
- Iozzo RV, Schaefer L.** Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, v. 42, p. 11-55, 2015.
- Jridi M, Nasri R, Marzougui Z, Abdelhedi O, Hamdi M, Nasri M.** Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 123, p. 1221-1228, 2019.

- 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.
- Khaw HL, Ponzoni RW, Danting MJC. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. *Aquaculture*, v. 275, p. 64-69, 2008.
- Konzen-Freitas AR, Abreu JG, Abreu JS, Dantas VLQ, Corrêa-Filho RAC, Povh JA. Tambaqui females (*Colossoma macropomum*) spawn after hormonal induction with buserelin acetate. *Animal Reproduction Science*, v. 221, p. 106594, 2020.
- 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.
- Legendre M, Billard R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Development*, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.
- Lobato JS, Pereira VA., Moreira FHG, Barbosa MSA, Rodrigues JAG, Araújo IWF, ... & Salmito-Vanderley CSB. Suplementação do meio criodiluidor com polissacarídeos sulfatados de macroalgas verdes na congelamento do sêmen de *Colossoma macropomum*. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 43, n. 6, p. 2769-2784, 2022.
- Lopes MC, Silva NJR, Henrique MB. Custos e viabilidade econômica da produção de alevinos de lambaris reproduzidos artificialmente. *Informações Econômicas*, v. 44, n. 6, p. 60-68, 2014.
- Lopes JT, Oliveira-Araújo MS, Nascimento RV, Ferreira YM, Montenegro AR, Salmito-Vanderley CSB. Efeito de vitaminas e aminoácidos como suplementação da solução crioprotetora para a criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46: 1593, 2018.
- Luyet BJ, Hodapp EL. Revival of Frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Exp Biol Med*, v.39, n.3, p.433-434, 1938.
- Martínez-Páramo S, Pérez-Cereales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JA, Herraáz MP. Cryobanking as tools for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potencial. *Theriogenology*, v. 71, p. 594-604, 2009.
- Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Soares F, Sarasquete C, Cabrita, E. Effect of two sulfur-containing aminoacids, taurine and hypotaurine in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 66, p. 333-338, 2013.
- Medina SPV. Criopreservação do sêmen de pirapitinga *Piaractus brachipomus* (PISCES, CHARACIDAE). 2008.
- Melo-Maciél MAP, Leite-Castro LV, Leite JS, Oliveira MS, Almeida-Monteiro PS, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB. Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v. 67, n. 3, p. 945-949, 2015.
- 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.
- otta NC, Egger RC, Monteiro KS, Oliveira AV, Murgas LDS. Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Theriogenology*, v. 179, p. 14-21, 2022.
- Mourão PAS, Pereira MS. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, n.3, p. 516-534, 2010.
- Mylonas CC, Duncan NJ, Asturiano JF. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*, v. 472, p. 21-44, 2017.
- Najafi A, Najafi M, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H. Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidant. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, n. 6, p. 934-940, 2014.
- Nascimento RV, Leite-Castro LV, Montenegro AR, Oliveira-Araújo MS, Lopes JT, Almeida-Monteiro PS, Ferreira YM, Salmito-Vanderley CSB. Influência do tempo de resfriamento e soluções diluentes sobre a congelabilidade do sêmen de *Prochilodus brevis*. *Acta Scientiae Veterinariae*; v. 45, p.1-9. 2017.
- Nascimento RV, Pereira VA, Almeida-Monteiro PS, Sales YS, Araújo IWF, Rodrigues JAG, ... & Salmito-Vanderley CSB. Use of glycosaminoglycans from *Oreochromis niloticus* skin as an antioxidant



supplement for milt cryopreservation of Brazilian bocachico. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 42, n. 5, p. 2959-2978, 2021.

Nascimento RV, Almeida-Monteiro PS, Pereira VA, Torres TM, Nunes LT, Sales YS, ... & Salmito-Vanderley CSB. Sulfated polysaccharides from seaweed as a supplement to *Prochilodus brevis* sperm freezing medium. *Cryoletters*, v. 43, n. 2, p. 110-119, 2022.

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: Ciências Agrárias*; 37(3): 1643-1654. 2016.

Öğretmen F, Inanan BE, Kutluyer F, Kayim M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on post thaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*, v. 83, n. 9, p. 1548-1552, 2015.

Oliveira AV. Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri*. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

Oliveira FCE. Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada à crioprotetores - estudo de toxicidade. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

Orfão LH, Maria NA, Nascimento AF, Isaú ZA, Viveiros ATM. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research*, v. 41, p. 679-687, 2010.

Palhares PC, Assis IDL, Machado GJ, De Freitas RM, Freitas MB, Paula DA, Murgas LDS. Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of *Brycon orbignyanus* cryopreserved with melatonin in different freezing curves. *Theriogenology*, v. 176, p.18-25, 2021.

Pereira VA, Alencar DB, Araújo IWF, Rodrigues JAG, Lopes JT, Nunes LT... & Salmito-Vanderley CSB. Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) semen. *Aquaculture*, v. 528, p. 735553, 2020.

Pereira VA, Nascimento RV, Almeida-Monteiro PS, Oliveira-Araújo MS, Ferreira YM, Torres TM, & Salmito-Vanderley CSB. The effect of glycosaminoglycans, extracted from the skin of tilapia, in the sperm freezing medium of *Colossoma macropomum*. *Cryoletters*, v. 42, n. 5, p. 272-282, 2021.

Peter RE, Lin HR, Van der kraak G. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, v. 74, n. 1-2, p. 1-10, 1988.

Pickett BW, Squires EL, Mackinnon AO. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins: Colorado State University, *Animal Reproduction Laboratory*.125p. 1987.

Pires LB, Sanches EA, Romagosa E, Corrêa-Filho RAC, Nass RAR, Lopera-Barrero NM, Povh JA. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after room-temperature and cold storage. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 35, n. 3, p. 747-753, 2019.

Qian L, Yu S, Zhou Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 87, p. 287-289, 2016.

Ravinder K, Nasaruddin K, Majumdar K C, Shivaji S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology*, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, 1997.

Rubinsky B. Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Failure Reviews*, v. 8, n. 3, p. 277-284, 2003.

Sales YS, Lobato JS, Vieira CTNS, Ferreira YM, Apoliano MLDS, Nascimento RVD, ... & Salmito-Vanderley CSB. Supplementation of Sulfate Polysaccharides in the Seminal Cooling Medium of Common Curimatã (*Prochilodus brevis*). *Cryoletters*, v. 44, n. 4, p. 208-218, 2023.

Salmito-Vanderley CSB, Vieira MJAF, Leite LV, Oliveira FCE, Linhares FRA, Salgueiro CCM, Nunes JF. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*, 22(1), 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.

Salmito-Vanderley CSB, Almeida-Monteiro PS, Nascimento RV. Tecnologia de conservação de sêmen de peixes: resfriamento, congelamento e uso de antioxidantes. *R. bras. Reprod. Anim.*, 194-199. 2016



- Sarosiek B, Dryl K, Kucharczyk D, Zarski D, Kowalski RK.** Motility parameters of perch spermatozoa (*Perca fluviatilis* L.) during short-term storage with antioxidants addition. *Aquacult Int*, 22:159–165, 2014.
- Sato Y, Sampaio EV, Fenerich-Verani N, Verani JR.** Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, n. 1, p. 267-273, 2006.
- Scott AP, Baynes SM.** A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, v. 17, n. 6, p. 707-739, 1980.
- Sevignani D, Buzzacaro E, Fortuna NB.** Monitoramento da hora-grau necessária para extrusão de ovócitos de reprodutoras de *Colossoma macropomum*. *Scientific Electronic Archives*, v. 13, n. 6, p. 57-63, 2020.
- Shaliutina A, Hulak M, Gazo I, Linhartova P, Linhart O.** Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Animal reproduction science*, v. 139, n. 1-4, p. 127-135, 2013.
- Shazada NE, Alavi SMH, Siddique MAM, Cheng Y, Zhang S, Rodina M, Linhart O.** Short-term storage of sperm in common carp from laboratory research to commercial production—A review. *Reviews in Aquaculture*, p. 1-16, 2023.
- Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R.** Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.* v. 31, n. 3, p. 231 – 243, 2000.
- Teodozia ERP, Araújo MSO, Lopes JT, Montenegro AS..., & Salmito-Vanderley CSB.** Criopreservação seminal de *Piaractus mesopotamicus*: efeito de diferentes diluentes e equipamentos de congelamento. *Revista Ciência Agronômica*, v. 51, p. e20196754, 2020.
- Torres TM, Almeida-Monteiro PSD, Nascimento RVD, Pereira VA, Ferreira YM, Lobato JS, ... & Salmito-Vanderley CSB.** Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using different concentrations of non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction*, v. 19, n. 1, p. e20210083, 2022.
- Torres TM, Almeida-Monteiro OS, Nascimento RV, Cândido-Sobrinho AS, Sousa CTN, Ferreira YM., ... & Salmito-Vanderley CSB.** Effects of taurine, cysteine and melatonin as antioxidant supplements to the freezing medium of *Prochilodus brevis* sperm. *Cryobiology*, v. 114, p. 104858, 2024.
- 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*. *Animal Reproduction Science*, 157, 71-77. 2015.
- Ventueri R, Bernardino G.** Hormônios na reprodução artificial de peixes. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, v. 9, n.55, p. 39-4, 1999.
- Vieira CTNS, Sales YS, Lobato JS, Apoliano MLDS, Ferreira YM, Cândido-Sobrinho SA, ... & Salmito-Vanderley CSB.** Evaluation of different hormone inducers on the reproduction of *Prochilodus brevis* males. *Revista Ciência Agronômica*, v. 55, p. e20228660, 2023.
- Viveiros ATM, Godinho HP.** Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, p. 137-150, 2009.
- Viveiros ATM, Taffarel TR, Leal, Marcelo CL.** Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. *Neotropical Ichthyology*, v. 12, n. 3, p. 643-648, 2014.
- Xin M, Siddique MAM, Dzyuba B, Cuervas-Urbe R, Shaliutina-Kolesova A, Linhart O.** Progress and challenges of fish sperm vitrification: a mini review. *Theriogenology*, v.98, p.16-22, 2017.
- 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.
- Woynarovich E, Horváth L.** A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO, 1983.
- Zaniboni-Filho E, Weingartner M.** Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.367-373, 2007.
- Zohar Y, Mylonas CC.** Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, v. 197, p. 99-136, 2001.