

# Protocolo para congelamento e descongelamento do sêmen de tambaqui em macropalhetas

*Vinicius Augusto Dias Filho<sup>1</sup>, Danillo dos Santos Santana<sup>2</sup>, Sidney Sales Cavalcante<sup>3</sup>, Anna Lauren Costa Nascimento<sup>4</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>5</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>6</sup>, Paulo César Falanghe Carneiro<sup>7</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>8</sup>*

## Resumo

O tambaqui tem sido alvo de diversos estudos relacionados à criopreservação seminal, tanto para dar suporte ao programa de melhoramento genético atualmente em andamento, quanto para o uso em escala comercial. Apesar da existência de alguns protocolos de criopreservação de sêmen do tambaqui em palhetas, ainda há a necessidade de estudos com outros recipientes com maior capacidade de armazenamento visando à consolidação da técnica para a aplicação em escala comercial. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de criopreservação seminal do tambaqui em macropalhetas de 4,0 mL, a partir da definição de um meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação temperatura/tempo no descongelamento do sêmen. No experimento 1, amostras de sêmen foram diluídas em seis meios diluidores preparados a partir da combinação do crioprotetor metilglicol (5, 10 ou 15%) e gema de ovo (0 ou 5). Após a diluição, o sêmen permaneceu em contato com cada meio diluidor durante 4, 20 ou 40 minutos (tempo de equilíbrio) antes do início do congelamento. No experimento 2, foi avaliada a

<sup>1</sup> Engenheiro de Pesca, mestre em Zootecnia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Graduando em Engenharia de Pesca, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Engenheiro de Pesca, mestre em Zootecnia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup> Engenheiro de Pesca, mestre em Zootecnia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Zootecnista, doutor em Aqüicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Médico-veterinário, doutor em Medicina veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>8</sup> Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

influência da temperatura e tempo de descongelamento na qualidade seminal do tambaqui. Para isso, amostras de sêmen congeladas foram descongeladas em banho-maria nos seguintes tratamentos: 30°C por 50s (T1) e 80s (T2) e 60°C por 25s (T3) e 40s (T4). Melhores resultados de cinética espermática foram obtidos com o sêmen diluído no meio composto por 5% de metilglicol acrescido de 5% de gema de ovo, o qual deve ser congelado 4 min após a diluição (motilidade total - 60%). O descongelamento a 60°/25s apresentou melhores resultados de motilidade total (55%) que os protocolos 30°C/50s, 30°/80s e 60°/50s (temperatura/tempo). Ao final do estudo concluiu-se que o protocolo ideal para criopreservação do sêmen do tambaqui em macropalhetas de 4,0 mL consiste na diluição do sêmen na proporção de 1:9 (v:v) em um meio diluidor composto por 5% de metilglicol e 5% de gema de ovo, os quais devem permanecer em contato por 4 minutos até que sejam submetidos ao processo de congelamento em botijão dry-shipper. O descongelamento das amostras deve ser realizado em banho-maria a 60°C por 25s.

**Palavras-chave:** cinética espermática, crioprotetor, gema de ovo, metilglicol, peixe.

## Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de peixe oriunda da Bacia Amazônica de grande importância na piscicultura nacional. Atualmente ocupa a segunda posição entre as espécies nativas mais produzidas no país. As técnicas de reprodução artificial do tambaqui estão bem difundidas, no entanto o acelerado desenvolvimento da cadeia produtiva demanda tecnologias que deem suporte ao melhoramento genético da espécie (RESENDE et al., 2010).

A criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante na reprodução artificial de peixes, que pode ser utilizada na otimização do manejo, na formação de bancos de germoplasma e no desenvolvimento de programas de melhoramento genético, com a possibilidade de minimizar ou resolver problemas como a assincronia da maturidade sexual e a distância entre os animais doadores de gametas (LOPES et al., 2014; MARIA et al., 2012). Contudo, o sucesso da técnica de criopreservação de sêmen depende do domínio e o equilíbrio entre vários fatores que envolvem o processo como o conhecimento das

características seminais da espécie; a composição do meio em que o sêmen é diluído; o tempo de exposição do sêmen a este meio diluidor antes do processo de congelamento; a taxa em que sêmen é diluído neste meio; os métodos utilizados no resfriamento, no momento do congelamento e no aquecimento, no momento do descongelamento (MARIA et al., 2011).

As macropalhetas, inicialmente desenvolvidas para envasar sêmen de mamíferos, já foram utilizadas para criopreservar sêmen de peixes e apresentaram resultados satisfatórios de cinética espermática e fertilização (VELASCO-SANTAMARIA et al., 2006; VIVEIROS et al., 2009). Dentre as vantagens da utilização das macropalhetas na criopreservação estão a maior capacidade de armazenamento, facilidade de envase e aplicação pós-descongelamento e a possibilidade de reutilização. Até o momento, não existem estudos relativos à criopreservação do sêmen de tambaqui em macropalhetas. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo de criopreservação de sêmen de tambaqui em macropalhetas com capacidade de armazenamento de 4,0 mL de volume útil, a partir da definição de um meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação entre a temperatura e o tempo no descongelamento do sêmen.

## Material e Métodos

O sêmen utilizado no estudo foi coletado em tubos de vidro de tambaquis ( $6,7 \pm 0,9$  Kg) provenientes da Piscicultura Santa Clara, em Propriá-SE e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Itiúba, em Porto Real do Colégio-AL. Logo após a coleta o sêmen foi resfriado e acondicionado em caixa térmica com a temperatura interna próxima a oito graus centígrados, para o transporte até o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju. Em laboratório as amostras foram examinadas quanto à pré-ativação, contaminação pela identificação de sangue, urina e fezes, e quanto ao percentual de motilidade onde foram selecionadas amostras com o percentual acima de 80%, através da análise subjetiva após ativação dos espermatozoides com bicarbonato de sódio 230 mOsm.

No Experimento 1, foram utilizados pools ( $n = 4$ ), formados pela união de amostras de sêmen de três machos. Amostras de sêmen in natura (Valores

médios dos parâmetros de cinética: MT -  $89 \pm 4\%$ , MP -  $33 \pm 10\%$ , rápidos -  $49\%$ , VCL -  $99 \pm 6 \mu\text{m/s}$ , VSL -  $59 \pm 8 \mu\text{m/s}$ , VAP -  $82 \pm 6 \mu\text{m/s}$ ) foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: meio diluidor) em meios diluidores compostos pela solução de glicose (290 mOsm) e pelo crioprotetor metilglicol em diferentes concentrações, na ausência ou presença de gema de ovo, formando seis diferentes meios: M1 (5% de Metilglicol); M2 (5% de Metilglicol + 5% de gema de ovo); M3 (10% de Metilglicol); M4 (10% de Metil glicol + 5% de gema de ovo) (MARIA et al., 2015); M5 (15% de Metil glicol) e M6 (15% de Metil glicol + 5% de gema de ovo). O sêmen diluído foi envasado em macropalhetas de 4,0 mL (Minitub<sup>®</sup>; polipropileno; 5 x 240 mm), sendo submetido a três diferentes tempos de exposição ao meio diluidor (4, 20 e 40 minutos), antes do processo de congelamento em vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L) a  $-166^\circ\text{C}$ , em botijão dry-shipper (MVE SC4/2V, GA, EUA).

No segundo experimento, amostras de quatro pools de sêmen, formados pela união de amostras de sêmen de três machos (Valores médios dos parâmetros de cinética: MT -  $91 \pm 3\%$ , MP -  $48 \pm 4\%$ , rápidos -  $53 \pm 4\%$ , VCL -  $102 \pm 2 \mu\text{m/s}$ , VSL -  $71 \pm 2 \mu\text{m/s}$ , VAP -  $88 \pm 2 \mu\text{m/s}$ ) foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: meio diluidor) em solução de congelamento de constituída de 10% de metilglicol, 5% de gema de ovo solução e 75% de solução de glicose 290 mOsm (MARIA et al., 2015). As amostras representativas de cada pool foram descongeladas de acordo com quatro protocolos diferentes, utilizando banho-maria, formando os seguintes tratamentos:  $30^\circ\text{C}$  por 50s (T1) e 80s (T2) e  $60^\circ\text{C}$  por 25s (T3) e 40s (T4).

A cinética dos espermatozoides foi analisada através do software Sperm Class Analyzer<sup>®</sup> (SCA, Microptics, Versão 5.1 SL, Barcelona, Espanha) configurado para sêmen de tambaqui. Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); percentual de espermatozoides com movimentos rápidos (VCL acima de  $100 \mu\text{m/s}$ ); velocidades curvilínea (VCL), em linha reta (VSL) e da trajetória média (VAP). Os resultados expressaram a média obtida através da captura três campos de imagem com aproximadamente 200 espermatozoides/cada.

Os dados de cinética espermática pós-descongelamento foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-wilk (5%) pelo software Assistat versão 7.7

beta e transformados pela fórmula  $F(x) = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ , no caso dos dados não normais. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e analisados pelo software Sisvar. 5.3 Build 77, através da análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-knott ao nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

Os resultados de cinética espermática pós-descongelamento de acordo com o meio diluidor e o tempo de equilíbrio estão descritos na Tabela 1. Houve interação significativa entre os meios diluidores e os tempos de equilíbrio apenas no parâmetro de MT ( $P < 0,05$ ). Nos parâmetros de MP, Rápidos, VCL, VSL e VAP os melhores resultados foram obtidos no tempo de equilíbrio de 4 min. Os meios diluidores com 5% de metilglicol sem gema de ovo (M1) e 5% e 10% de metilglicol com 5% de gema de ovo (M2 e M4) foram superiores aos demais no parâmetro de VAP ( $P < 0,05$ ). No parâmetro de motilidade total houve uma superioridade dos meios diluidores contendo 5 ou 10% de metilglicol e 5% de gema de ovo (M2 e M4), no tempo de equilíbrio de 4min. A VCL dos espermatozoides diluídos no meio M2 foi superior a aquela encontrada nos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ) expostos ao tempo de equilíbrio de 4 min.

**Tabela 1.** Resultados da cinética espermática pós-descongelamento do sêmen de tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0 mL de acordo com os tratamentos em esquema fatorial 6x3 (seis meios diluidores x três tempos de equilíbrio).

Parâmetro	Tempo de equilíbrio (min)	Meios diluidores						Média
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	
MT (%)	4	43 ± 4 <sup>BA</sup>	60 ± 3 <sup>BA</sup>	45 ± 14 <sup>BA</sup>	58 ± 10 <sup>BA</sup>	39 ± 12 <sup>BA</sup>	37 ± 9 <sup>BA</sup>	
	20	45 ± 8 <sup>BA</sup>	49 ± 14 <sup>AB</sup>	38 ± 9 <sup>BA</sup>	43 ± 16 <sup>AB</sup>	29 ± 10 <sup>AB</sup>	26 ± 9 <sup>BA</sup>	
	40	42 ± 9 <sup>BA</sup>	43 ± 12 <sup>AB</sup>	31 ± 9 <sup>BA</sup>	37 ± 8 <sup>AB</sup>	34 ± 11 <sup>AB</sup>	28 ± 11 <sup>BA</sup>	
MP (%)	4	7 ± 1	9 ± 3	8 ± 4	15 ± 5	3 ± 2	2 ± 1	7 ± 5 <sup>A</sup>
	20	6 ± 2	10 ± 8	3 ± 2	9 ± 4	0	1 ± 1	4 ± 4 <sup>B</sup>
	40	5 ± 3	5 ± 3	2 ± 1	4 ± 2	0	0	3 ± 2 <sup>C</sup>
	Média	6 ± 1 <sup>a</sup>	8 ± 2 <sup>a</sup>	4 ± 3 <sup>b</sup>	9 ± 6 <sup>a</sup>	1 ± 1 <sup>c</sup>	1 ± 1 <sup>c</sup>	
Sptz rápidos (%)	4	6 ± 1	10 ± 4	7 ± 3	13 ± 4	2 ± 1	2 ± 1	7 ± 4 <sup>A</sup>
	20	5 ± 2	10 ± 8	2 ± 2	7 ± 4	1 ± 1	1 ± 1	5 ± 4 <sup>B</sup>
	40	4 ± 2	6 ± 3	2 ± 1	3 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	3 ± 2 <sup>B</sup>
	Média	5 ± 1 <sup>a</sup>	9 ± 2 <sup>a</sup>	4 ± 3 <sup>b</sup>	8 ± 5 <sup>a</sup>	2 ± 1 <sup>c</sup>	1 ± 1 <sup>c</sup>	
VCL (µm/s)	4	53 ± 3	62 ± 4	51 ± 8	57 ± 5	45 ± 4	47 ± 6	52 ± 6 <sup>A</sup>
	20	51 ± 5	56 ± 12	43 ± 3	54 ± 8	39 ± 7	32 ± 5	46 ± 10 <sup>B</sup>
	40	47 ± 5	52 ± 4	40 ± 4	43 ± 5	41 ± 6	40 ± 7	44 ± 5 <sup>B</sup>
	Média	50 ± 3 <sup>b</sup>	57 ± 5 <sup>a</sup>	45 ± 6 <sup>c</sup>	51 ± 7 <sup>b</sup>	41 ± 3 <sup>c</sup>	40 ± 7 <sup>c</sup>	
VSL (µm/s)	4	21 ± 4	24 ± 7	19 ± 7	28 ± 4	10 ± 4	8 ± 2	18 ± 8 <sup>A</sup>
	20	17 ± 3	26 ± 12	10 ± 4	23 ± 8	3 ± 1	4 ± 3	14 ± 10 <sup>B</sup>
	40	15 ± 5	19 ± 6	10 ± 4	12 ± 4	3 ± 1	3 ± 1	10 ± 6 <sup>C</sup>
	Média	18 ± 3 <sup>a</sup>	23 ± 4 <sup>a</sup>	13 ± 5 <sup>b</sup>	21 ± 8 <sup>a</sup>	5 ± 4 <sup>c</sup>	5 ± 3 <sup>c</sup>	
VAP (µm/s)	4	31 ± 5	37 ± 7	28 ± 8	38 ± 4	19 ± 5	18 ± 2	29 ± 9 <sup>A</sup>
	20	28 ± 4	36 ± 12	18 ± 5	33 ± 9	11 ± 3	11 ± 3	23 ± 11 <sup>B</sup>
	40	24 ± 6	29 ± 5	18 ± 4	21 ± 5	13 ± 2	12 ± 2	19 ± 7 <sup>C</sup>
	Média	27 ± 4 <sup>a</sup>	34 ± 4 <sup>a</sup>	21 ± 6 <sup>b</sup>	31 ± 9 <sup>a</sup>	14 ± 4 <sup>c</sup>	14 ± 4 <sup>c</sup>	

<sup>a-b, A-B</sup> Médias seguidas por letras minúsculas (linha) ou maiúsculas (coluna) distintas diferem entre si pelo teste de Skott-knott, dentre as soluções de congelamento ou dentre os tempos de equilíbrio, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Sptz = espermatozoides; Rápidos (VCL acima de 100µm/s). MT – motilidade total, MP – motilidade progressiva, VCL – velocidade curvilinear, VSL – velocidade em Linha Reta, VAP – velocidade média da trajetória. M1 - 5% de Metilglicol; M2 - 5% de Metilglicol + 5% de gema de ovo; M3 - 10% de Metilglicol; M4 - 10% de Metilglicol + 5% de gema de ovo; M5 - 15% de Metilglicol; M6 - 15% de Metilglicol + 5% de gema de ovo.

Os resultados da cinética espermática após a submissão aos protocolos de descongelamento estão descritos na tabela 2. O percentual de espermatozoides móveis (MT) do descongelamento T3 (60°C/25s) foi superior aos demais ( $P < 0,05$ ). Em relação à motilidade progressiva, as macropalhetas descongeladas às temperaturas de 30 °C por 80 s e a 60 °C durante 25 s apresentaram igualdade ( $P > 0,05$ ) e foram superiores aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Não foi detectada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos parâmetros de percentual de rápidos, VCL, VSL e VAP entre os quatro tratamentos aplicados.

**Tabela 2.** Cinética espermática no sêmen de tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0 mL de acordo com o protocolo de descongelamento combinando diferentes temperaturas e tempos em banho-maria.

Parâmetro	Protocolo de Descongelamento			
	30°C/ 50s	30°C/ 80s	60°C/ 25s	60°C/ 40s
MT (%)	49 ± 6 <sup>b</sup>	49 ± 8 <sup>b</sup>	55 ± 8 <sup>a</sup>	46 ± 8 <sup>b</sup>
MP (%)	15 ± 5 <sup>b</sup>	20 ± 7 <sup>a</sup>	20 ± 11 <sup>a</sup>	12 ± 8 <sup>b</sup>
Sptz Rápidos (%)	13 ± 4	17 ± 6	18 ± 10	12 ± 8
VCL (µm/s)	63 ± 8	72 ± 7	70 ± 17	63 ± 11
VSL (µm/s)	37 ± 10	47 ± 9	43 ± 20	30 ± 16
VAP (µm/s)	47 ± 11	58 ± 9	54 ± 22	41 ± 17

a-b Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-knott ( $P < 0.05$ ). Sptz = espermatozoides; Rápidos (VCL acima de 100 µm/s). MT – motilidade total, MP – motilidade progressiva, VCL – velocidade curvilínea, VSL – velocidade em linha reta, VAP – velocidade da trajetória média.

A manutenção da integridade e funcionalidade dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação depende, dentre outros fatores, da ação das substâncias que são utilizadas como crioprotetoras e suas concentrações no meio em que o sêmen é diluído (MARTÍNEZ; CARRASCO, 2010). Até então, o protocolo de criopreservação de sêmen de tambaqui que tem proporcionado ou melhores resultados de cinética espermática pós-descongelamento é constituído de 10% de metilglicol e 5% de gema de ovo em solução de glicose 290mOsm, com um tempo de equilíbrio de 20 minutos antes do congelamento em *dry shipper* (CARNEIRO et al., 2012; MARIA; CARNEIRO, 2012). Entretanto, nosso estudo mostra que é possível reduzir no percentual de metilglicol para 5% no meio diluidor, desde que o tempo de

equilíbrio seja reduzido para 4 minutos. Este fato mostra-se importante para as práticas de fertilização, pois reduz o potencial tóxico do metilglicol junto aos ovócitos e mesmo aos espermatozoides. Em nosso estudo verificamos que a presença da gema de ovo no meio diluidor melhora a qualidade espermática pós-descongelamento desde que combinada ao crioprotetor metilglicol até o nível de 10%, evidenciando sua importância na criopreservação do sêmen de tambaqui. Isto se justifica pela prevenção da ruptura da membrana celular durante o processo de congelamento pela reposição de fosfolipídios perdidos durante o choque térmico (VIVEIROS et al., 2014). Os melhores resultados no congelamento do sêmen foram observados nas amostras submetidas ao menor tempo de equilíbrio (4 minutos). Isso pode estar relacionado à toxicidade do crioprotetor metilglicol, em consequência do tempo de exposição dos espermatozoides a esta substância.

De maneira geral, o sêmen criopreservado de espécies de peixes tropicais apresenta melhores índices de motilidade e vigor após descongelamento em temperaturas dentro da faixa de 30 a 60°C (VIVEIROS et al., 2014). Apesar da temperatura de 30°C ser próxima a temperatura de 35°C que proporcionou melhores resultados no descongelamento de sêmen de outras espécies de peixes envasadas em macropalhetas de 4,0mL (MEDINA-ROBLES et al., 2007; VELASCO-SANTAMARIA et al., 2006), o melhor tratamento aplicado neste estudo foi o descongelamento a 60°C por 25 segundos, corroborando com os estudos existentes com o sêmen de tambaqui criopreservado em outros recipientes que utilizaram temperaturas de descongelamento variadas, mas apresentaram os melhores resultados de cinética espermática a partir do descongelamento a 60°C (CARNEIRO et al., 2012; GODINHO; VIVEIROS, 2011; MARIA e CARNEIRO, 2012; VARELA-JR et al., 2012).

A avaliação da cinética espermática é fundamental para se analisar o sucesso do processo de criopreservação e o potencial de fecundação dos espermatozoides (ALAVI; COSSON, 2005). Os parâmetros de espermatozoides rápidos, VCL, VSL e VAP estão correlacionados com o potencial de fertilização dos espermatozoides de peixes (GALLEGO et al., 2013; RURANGWA et al., 2004). A qualidade seminal, próxima àquela encontrada na literatura para o sêmen da mesma espécie criopreservado nas tradicionais palhetas de 0,5 mL (CARNEIRO et al., 2012) e criotubos



de 1,6 e 4,5 mL (MARIA et al., 2015), associados à elevada quantidade de sêmen armazenado, apontam que, o sêmen do tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0 mL poderá ser utilizado de forma promissora em práticas de fertilização atendendo a elevada demanda por espermatozoides frente a grande produção de ovócitos.

## Conclusão

Ao final do estudo concluiu-se que o protocolo ideal para criopreservação do sêmen do tambaqui em macropalhetas de 4,0mL consiste na diluição do sêmen na proporção de 1:9 (v: v) em um meio diluidor composto por 5% de metilglicol e 5% de gema de ovo, os quais devem permanecer em contato por 4 minutos até que sejam submetidos ao processo de congelamento em botijão *dry-shipper*. O descongelamento das amostras deve ser realizado em banho-maria a 60°C por 25s.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapitec pelo apoio financeiro e aos responsáveis-técnicos e funcionários da Piscicultura Santa Clara e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura pelo apoio na coleta do sêmen.

## Referências

ALAVI, S. M.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.

CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters*, v. 33, p. 385-393, 2012.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization

and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). **Aquaculture**, v. 416, p. 238-243, 2013.

GODINHO, H. P.; VIVEIROS, A. T. M. Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: TIERSCH T.R.; GREEN, C.C. (Ed.). **Cryopreservation in Aquatic Species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 875-884.

LOPES, J. T.; PINHEIRO, J. P. S.; NUNES, L. T.; PINHEIRO, R. R. R.; SOUZA, M. E. M.; ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, R. V.; CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 170-175, 2014.

MARIA, N. A.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v. 20, p. 39-43, 2011.

MARIA, N. A.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARIA, N. A.; CARVALHO, A. C. M.; ARAÚJO, R. V.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 109-114, 2015.

MARTÍNEZ, J. G.; CARRASCO, S. P. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. **Acta Biológica Colombiana**, v. 15, n. 2, p. 3-24, 2010.

MEDINA-ROBLES, V. M.; VELASCO-SANTAMARIA, Y. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 39, n. 3, p. 229-237, 2007.

RESENDE, E. K.; OLIVEIRA, C. A. L.; LEGAT, A. P.; RIBEIRO, R. P.

**Melhoramento animal no Brasil: Uma visão crítica para espécies aquáticas.**

Maringá: Sociedade Brasileiro de Melhoramento Animal, 2010.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factor affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1, p. 1-28, 2004.

VARELA-JR, A.S.; CORCINI, C.D.; STREIT-JR, D.P.; RIZZOTO, G.; JARDIM, R.D.; LUCIA, J.R.T.; FIGUEIREDO, M.R.C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlantica**, v. 34, n. 2, p. 129-137, 2012.

VELASCO-SANTAMARIA, Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZCASALLAS, E. P. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, v. 256, n. 4, p. 267-271, 2006.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A. Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 293-300, 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e conservação de espermatozoides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Ed.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 2014. p. 307-327.