

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

ALESSANDRA ARENHARDT EIDT

**FORMAÇÃO DE BANCOS DE GERMOPLASMA E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA A
CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES E AQUICULTURA**

Porto Alegre
2013

ALESSANDRA ARENHARDT EIDT

**FORMAÇÃO DE BANCOS DE GERMOPLASMA E SUA CONTRIBUIÇÃO
PARA A CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES E AQUICULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção da
Graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Júnior

Porto Alegre

2013

RESUMO

A importância dos recursos genéticos animais para a manutenção da vida selvagem, bem como para a produção agropecuária tem se tornado cada vez mais evidente nos últimos anos. Os estoques pesqueiros encontram-se globalmente ameaçados principalmente devido à sobrepesca e a poluição ambiental. A aquicultura, conseqüentemente, tem se tornado uma atividade importante para a produção de alimentos de alta qualidade, a fim de atender à demanda crescente de proteína em âmbito mundial, e ao mesmo tempo protege as populações naturais da sobrepesca.

Programas de conservação para peixes selvagens e cultivados têm sido estabelecidos em todo o mundo, a fim de protegê-los da extinção. A criopreservação do germoplasma aquático traz a possibilidade de preservar o genoma de espécies ameaçadas de extinção, aumenta a representação de animais geneticamente valiosos para fins de exploração aquícola e evita perdas genéticas por meio de doenças e catástrofes. Este estudo constitui uma revisão bibliográfica na qual serão discutidos os principais métodos de criopreservação dos gametas de peixes e seus problemas, será abordada também uma visão geral sobre bancos de germoplasma e a situação atual da conservação de recursos genéticos no Brasil.

Palavras-chave: criopreservação, germoplasma, aquicultura.

ABSTRACT

The importance of animal genetic resources for the maintenance of wildlife as well as to agricultural production has become increasingly apparent in recent years. Fish stocks are threatened worldwide mainly due to overfishing and environmental pollution. Aquaculture, consequently, has become an important activity for the production of high quality food in order to attend the growing demand for protein worldwide, and at the same time protecting the natural populations from overfishing.

Programs for the conservation of wild and farmed fish have been established around the world in order to protect them from extinction. Cryopreservation of aquatic germplasm brings the ability to preserve the genome of endangered species, increase the representation of genetically valuable animals for the purposes of aquaculture and avoids genetic losses through diseases and disasters. This study is a literature review in which will be discussed the main methods of cryopreservation of fish gametes and their problems, will be addressed also an overview of genebanks and the current status of conservation of genetic resources in Brazil.

Keywords: cryopreservation, germplasm, aquaculture.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
2.1 Banco de Germoplasma	07
2.1.1 A Aquicultura e o Banco Genético	09
2.1.2 Gerenciar e construir um Banco de Germoplasma	10
2.2 Estratégias de conservação	11
2.3 Criopreservação	13
2.3.1 Danos causados pela preservação em baixas temperaturas	16
2.3.2 Crioprotetores	18
2.3.3 Técnicas de criopreservação	19
2.3.4 Criopreservação de Esperma	20
2.3.5 Criopreservação de Embriões	28
2.3.6 Criopreservação de Oócitos	29
2.4 Conservação de recursos genéticos no Brasil	31
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa devido a múltiplos impactos ambientais. A ictiofauna, que corresponde a aproximadamente 25% das espécies de vertebrados existentes (Reis et al., 2003), vêm sofrendo os efeitos das mudanças ambientais como poluição, desmatamento, assoreamento, sobrepesca e construção de barragens, entre outros (AGOSTINHO e JÚLIO Jr., 1999).

O resultado dessas alterações representa uma queda acentuada da biodiversidade aquática, em função da desestruturação do ambiente físico, químico e alterações na dinâmica e estrutura das comunidades biológicas (CALLISTO et al., 2001).

A escala da ameaça para a sobrevivência das espécies de peixes é maior do que para qualquer outro grupo de vertebrados, com 32% das espécies de 4446 até agora avaliadas e classificadas como 'ameaçadas'. No entanto, apenas 27.8% das cerca de 31 800 espécies de peixes foram avaliadas. O aumento do número de espécies de peixe ameaçadas ao longo dos últimos 12 anos a partir de 734 em 1996 / 1998 a 1414 em 2010, reflete tanto o aumento do número de espécies avaliadas e o contínuo declínio nas populações de peixes (RAWSON, REID & LLOYD., 2010)

No Reino Unido, com uma relativamente baixa biodiversidade de peixes, 41 espécies de peixes já são consideradas ameaçadas. Programas de conservação de criadouros de peixes começaram no início dos anos 1990 com o estabelecimento do Taxon Advisory Groups, o European Endangered Species Programmes e Species Survival Plans por associações nacionais e regionais de Zoológicos e Aquários dos Estados Unidos, Europa Continental e América do Norte (REID & HALL, 2003).

Visto que os peixes têm uma acentuada importância como fonte de alimento e de geração de riquezas, principalmente com o desenvolvimento expressivo das atividades da piscicultura e, mais recentemente, com a intensiva produção e comercialização de peixes híbridos, a conservação e manejo da biodiversidade, incluindo a variabilidade genética, devem ser priorizados (BARROSO et al., 2013).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Banco de Germoplasma

Muitas vezes denominado de "banco de recursos genéticos '(GRB) ou' banco genômico ', neste contexto GRBs se destinam a utilização como repositórios de germoplasma, que está disponível para utilização em procedimentos tais como a inseminação artificial ou transferência de embrião, quando necessário, e como uma interface entre os programas de conservação ex situ e in situ. Bancos de recursos genéticos diferem fundamentalmente de um banco de células e tecidos armazenados disponíveis apenas como um recurso para a pesquisa genética. O objetivo de programas de GRB é simples e diretamente útil, ele efetivamente aumenta a "expectativa de vida genética" dos indivíduos valiosos, que podem continuar a ser parte de programas de melhoramento gerenciados, mesmo depois de sua morte. Como o objetivo de programas de melhoramento gerenciados para espécies ameaçadas de extinção é a manutenção da máxima diversidade genética, os GRBs contribuem diretamente para os objetivos de conservação (HOLT & PICKARD., 1999).

Atualmente, os procedimentos para a utilização do germoplasma criopreservado não estão bem desenvolvidos para as espécies selvagens. Esta situação é, em parte, um reflexo da grande variedade de características de reprodução de diversas espécies, em que, por exemplo, diferenças na anatomia e fisiologia feminina afetam o momento da ovulação, o local da inseminação ou o número de espermatozoides necessários para a concepção. Como a função e sobrevivência do esperma são afetadas deletoriamente pela criopreservação, esses fatores afetam o sucesso de procedimentos de inseminação artificial. Um programa GRB devidamente organizado só pode funcionar quando o conhecimento básico da biologia reprodutiva da espécie em questão está disponível (HOLT & PICKARD., 1999).

Até o momento, os GRBs que foram iniciados para espécies ameaçadas de extinção se concentraram no armazenamento de sêmen congelado, por exemplo, no bisão (*Bison bonasus*) (SIPKO et al ., 1997), tigres (*Panthera tigris*) (WILDT et al., 1995) e gazelas (*Gazella dama* Mhorr) (HOLT et al., 1996). Esta situação é, principalmente, um reflexo das limitações

técnicas da criopreservação de embriões e de oócitos na maioria das espécies (HOLT & PICKARD., 1999).

Segundo o ponto de vista etimológico, germoplasma é uma palavra de duas raízes: germo, do latim *gérmen*, significa princípio rudimentar de um novo ser orgânico e plasma, do grego *plasma*, define-se como a formação e, em sentido geral, a matéria não definida (RIBEIRO, 1995). Portanto, germoplasma é a matéria onde se encontra um princípio que pode crescer e se desenvolver (QUEROL, 1993). Ou como Santos (2003) define, a soma de todas as combinações de genes resultante da evolução de uma espécie constitui o seu germoplasma.

Uma amostra de germoplasma representativa de um indivíduo ou de vários indivíduos da população é denominada de acesso (BARBIERI, 2003). Os bancos de germoplasma têm como objetivos evitar a perda de recursos genéticos, conservar fontes de genes para uso futuro e colecionar, identificar e caracterizar genótipos para uso no melhoramento. (BARBIERI 2003). Por sua vez, os esforços de conservação *ex situ* são parte importante de uma estratégia de conservação integrada para proteger as espécies ameaçadas. Conservar *ex situ* congrega num só lugar a diversidade genética de uma ou de muitas espécies e facilita o acesso ao germoplasma para estudo ou distribuição (SANTOS, 2003; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A aquicultura tem se tornado uma atividade importante para a produção de alimentos de alta qualidade, a fim de atender à demanda crescente de proteína em âmbito mundial e ao mesmo tempo protege as populações naturais da sobrepesca (FAO, 2011) e a criopreservação de germoplasma e embriões combinada com a reprodução assistida desempenham um papel vital e contínuo na manutenção e melhoramento da agricultura animal (GODOY., 2012)

Os benefícios do sistema do banco de recursos genéticos para fins de conservação são ainda mais profundos do que para os animais domésticos. Além de preservar o vigor genético e aumentar a propagação em cativeiro, estes depósitos congelados podem fornecer um alto nível de segurança contra mais perdas de diversidade ou de espécies inteiras. Particularmente importante é que o material biológico pode ser recuperado a partir de animais de vida livre, armazenado e utilizado sem remover mais indivíduos de seus habitats nativos (WIIDT., 1992).

Os benefícios atuais e aplicações futuras das pesquisas de amostras de células e tecidos conservados em criobancos para a preservação, aquicultura e saúde animal são amplamente reconhecidos (MORRIS, 1981; MILLER, 1985; HOLT, 1995; HAGEDORN &

KLEINHANS, 2000; REID et al, 2008;. CLARKE, 2009) e incluem espaço para o mapeamento de todo o genoma e transplante nuclear para clonagem (RAWSON, REID & LLOYD., 2010).

A formação do banco tem uma aplicação direta na prospecção de biodiversidade para identificar possíveis espécies com potencial para piscicultura, além de identificar a diversidade genética das espécies comerciais em ambiente natural para conduzir a formação de plantel de reprodutores com alta diversidade genética. Adicionalmente, os piscicultores têm no banco de DNA a oportunidade de fornecer material genético das espécies produzidas na piscicultura do estado buscando identificar a estrutura genética das matrizes para detectar níveis de endogamia, bem como a ocorrência de híbridos entre os reprodutores, que podem causar contaminação genética ao estoque e depreciação na produção (BARROSO et al., 2013).

2.1.1 A Aquicultura e o Banco Genético

No último século, onde no início definia-se que os oceanos e outros recursos naturais eram inesgotáveis, em suas últimas décadas as autoridades científicas, técnicos, organizações governamentais e não governamentais, visualizaram um outro cenário onde se constatou o contrário, daí a grande preocupação com o futuro do planeta. As preocupações com os dias futuros tomaram direção rumo à preservação, deixando o homem de ser apenas um extrativista poluidor e transformando-se em extrativista conservacionista e produtor conservador, muito menos poluidor (AGENDA 21, 2000).

No decorrer dos anos a legislação tem avançado no sentido de conscientizar e cobrar a aplicabilidade da mesma, coibindo abusos contra agressões à natureza. Segundo documento elaborado em 1987, Nosso Futuro Comum, pela Comissão Mundial de Meio Ambiente e Desenvolvimento da ONU, a pesca e a aquicultura são atividades consideradas estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, pois estas são capazes de fornecer proteínas e gerar empregos, (AGENDA 21, 2000).

A aquicultura é a produção de organismos com hábitat predominantemente aquático, em cativeiro, em qualquer um de seus estágios de desenvolvimento. A atividade se caracteriza por três componentes: o organismo produzido deve ser aquático, deve existir um manejo para a produção, a criação deve ter um proprietário, ou seja, não é um bem coletivo como são as

populações exploradas pela pesca (RANA,1997). A aquíicultura utiliza recursos naturais, manufaturados e humanos, tais como: terra, água, energia, ração, fertilizantes, equipamentos, mão de obra etc. Portanto, estes devem ser usados de forma racional para que a atividade seja perene e lucrativa (VALENTI., 2002).

Recentemente, introduziu-se o conceito de "Aquicultura Sustentável" (ou "Aquicultura Responsável") para designar a forma desejável de se produzir organismos aquáticos, sem degradar o meio ambiente, com lucro e com benefícios sociais. A aquíicultura moderna envolve três componentes: a produção lucrativa, a preservação do meio ambiente e o desenvolvimento social. Estes são essenciais e indissociáveis para que a atividade seja perene (VALENTI., 2002).

A aquíicultura depende fundamentalmente dos ecossistemas nos quais está inserida. É impossível produzir sem provocar alterações ambientais. No entanto, pode-se reduzir o impacto sobre o meio ambiente a um mínimo indispensável, de modo que não haja redução da biodiversidade, esgotamento ou comprometimento negativo de qualquer recurso natural e alterações significativas na estrutura e funcionamento dos ecossistemas. Esta é uma parte do processo produtivo. Não se pode desenvolver tecnologia visando aumentar a produtividade sem avaliar os impactos ambientais produzidos (VALENTI., 2002).

O desenvolvimento da aquíicultura deve ser realizado de modo a preservar a diversidade genética e as técnicas de manejo devem ser desenvolvidas de modo a preservar as comunidades aquáticas e a integridade dos ecossistemas adjacentes às unidades de produção. Sendo assim, a criopreservação do germoplasma aquático traz a possibilidade de preservar o genoma de espécies ameaçadas de extinção, aumenta a representação de animais geneticamente valiosos para fins de exploração aquícola e evita perdas genéticas por meio de doenças e catástrofes (BALLOU, 1992; HAGEDOM et al.,2012).

2.1.2 Gerenciar e construir um Banco de Germoplasma

A conservação *ex situ* de germoplasma engloba uma série de atividades que começam com a aquisição do material, multiplicação e regeneração desses acessos, caracterização e avaliação dos mesmos. Estas atividades devem ser documentadas para o gerenciamento do banco, troca de informação e colaboração com outros centros de recursos genéticos (PAINTING *et al.*, 1995; SANTOS; BETTENCOURT, 2001).

Os dados do germoplasma podem ser organizados manualmente, porém sistemas computadorizados oferecem inúmeras vantagens. Os sistemas de documentação computadorizados registram a informação em bases de dados, e estão sendo cada vez mais utilizados. Dentre as vantagens desses sistemas, destaca-se a possibilidade de registrar e organizar minuciosa e sistematicamente a informação, agrupá-la e mantê-la atualizada. Também permitem localizar, recuperar rapidamente a informação e manter um volume considerável de dados. Ainda esses sistemas ocupam pouco espaço e, neles, os dados podem ser duplicados como medida de segurança (SANTOS; BETTENCOURT, 2001).

Um dos softwares mais usados na construção de bancos de dados relacionais é o Sistema Gerenciador de Banco de Dados (SGBD) Microsoft Access (BYRNE, 1997). Um banco de dados do Access é um conjunto de informações em que os dados armazenados se relacionam. Esta característica facilita o uso e gerenciamento de um banco de dados. Assim, um item de uma tabela pode ser automaticamente relacionado a um conjunto de itens de uma outra tabela. O relacionamento entre tabelas é essencial, já que este pode conter diversas tabelas, cada uma contendo dados sobre uma determinada entidade, mas contendo uma ou mais informações em comum (MATOS, 2004).

Uma das limitações do Microsoft Access é sua capacidade de armazenamento de dados. Essa limitação faz com que dados pesados, como fotos, não possam ser armazenados no banco, o que significa uma deficiência na busca de informação (BÜTTOW., 2005)

Uma vez que os recursos destinados à ciência e tecnologia são escassos, a construção e a utilização de um banco de dados para armazenar, gerenciar e manipular informações se constituem em uma forma de otimizar o uso dos recursos tanto financeiros quanto humanos (PAINTING *et al.*, 1995, SCUDELLER; MARTINS, 2003).

2.2 Estratégias de conservação

A preocupação com a biodiversidade no Brasil tem crescido acentuadamente nas últimas duas décadas, acompanhada pela proliferação de organizações conservacionistas não governamentais e pela legislação ambiental. Além disso, agências governamentais relevantes consolidaram-se e expandiram-se, levando à criação do Ministério do Meio Ambiente. Várias áreas protegidas foram criadas desde o início dos anos 80 e a mídia tem dado atenção recente para a conservação da vida silvestre (AGOSTINHO; THOMAZ & GOMEZ; 2005).

Aproximadamente 14% das espécies do mundo são encontradas no Brasil (LEWINSOHN & PRADO, 2002). Essa extraordinária biodiversidade ainda é, no entanto, pobremente conhecida. O número de espécies nos ecossistemas aquáticos continentais brasileiros ainda é impreciso e difícil de ser estimado. Mesmo assim o Brasil lidera o número de peixes de água doce, possuindo 2.122 espécies catalogadas (AGOSTINHO; THOMAZ & GOMEZ; 2005).

No Brasil 14 estados possuem espécies listadas de peixes ameaçados e a maioria é encontrada nas regiões Sudeste e Sul, especificamente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Isto pode ser o resultado de vários fatores: o Sudeste e Sul são as regiões mais desenvolvidas do país e, em decorrência disso, os ecossistemas aquáticos têm sofrido os maiores impactos e há muitas espécies endêmicas de distribuição restrita nessas regiões. A sobrepesca tem ameaçado as populações de várias espécies de peixes, o que levou a considerá-las como ameaçadas de sobreexploração. Entre estas se destacam o tambaqui (*Colossoma macropomum* [Characidae]) e os e jaraquis (*Semaprochilodus* spp. [Prochilodontidae]) da bacia Amazônica e pimelodídeos migradores como a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii* [Amazônia]), piraíba (*B.filamentosum* [Amazônia]) e jaú (*Zungaro zungaro* [de ampla distribuição]) (AGOSTINHO, THOMAZ & GOMES; 2005).

A conservação de recursos genéticos, tanto em animais como em plantas, possuem duas estratégias bem estabelecidas, denominadas de conservações em *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* representa a estratégia de manter o recurso genético protegido em seu local de origem e de distribuição geográfica, de modo geral, através de áreas de proteção ambiental ou áreas de acesso e uso restritos (BARROSO et al., 2013). Por outro lado, a estratégia de conservação *ex situ* indica que o recurso genético será preservado fora da área de origem ou de ocorrência natural, sendo este mantido em bancos de germoplasma, coleção de tecidos ou ainda criopreservados, neste caso para animais: sêmen, ovócitos, embriões, células somáticas e DNA. Os dois métodos de conservação visam manter a variabilidade genética dos organismos de interesse comercial ou de biodiversidade (TOLEDO-FILHO et al., 1998). No entanto, a estratégia de conservação *ex-situ* ainda pode ser de duas maneiras, o ativo, onde o recurso genético pode ser utilizado a qualquer momento para manutenção e inclusão de variabilidade genética em estoques cultivados, por exemplo, ou o preservado/inativos, onde as amostras de DNA são utilizadas para o conhecimento científico e aplicações tecnológicas (BARROSO et al., 2013). De modo geral os bancos ativos e preservados/inativos não possuem apenas a função de armazenar o material genético, sendo também responsáveis pelas

atividades de prospecção, coleta, introdução de variabilidade, intercâmbio, quarentena, caracterização, conservação, multiplicação e regeneração do germoplasma (TOLEDO-FILHO et al, 1999).

A preservação pode ser definida como qualquer processo que previne ou inibe rapidamente deterioração em espécimes inteiros ou outro material biológico. Ela retarda ou aprisiona o metabolismo em espécimes vivos e atrasa ou interrompe a biodeterioração de material pós-morte (RAWSON; REID & LLOYD., 2011).

Os processos metabólicos e biodeteriorantes que afetam espécimes mortos ou vivos dependem da temperatura. Estes são acelerados pelas altas temperaturas (até e excedendo 40 °C) e desacelerados acentuadamente abaixo de cerca de 8°C, dependendo do material (RAWSON; REID & LLOYD., 2011). A criopreservação (congelamento a temperaturas ultra-baixas "criogênicas" de -80 °C a -196 °C) é uma técnica contemporânea para a preservação e conservação dos tecidos vivos ou post mortem frescos, as células, gametas, embriões, sementes, material genético e corpos inteiros de animais, plantas e outros grupos taxonomicos, tais como fungos e bactérias (RAWSON; REID & LLOYD., 2011).

A criopreservação para materiais vivos (e.g.oleaginosas, de esperma, ovos e protozoários), com pouca ou nenhuma perda de viabilidade foi desenvolvido nos anos 1970 e 1980, quando foram estabelecidas as coleções de pesquisa em materiais congelados nos zoológicos e museus em todo o mundo (ASHWOOD-SMITH & FARRANT, 1980; DESSAUER & HAFNER, 1984; DRESSER, 2001)

Considerável progresso tem sido obtido recentemente no desenvolvimento de técnicas para a preservação de sêmen de peixes, sendo o processo criobiológico averiguado como o mais eficiente (STOSS & DONALDSON, 1982). A preservação desses gametas pode apresentar um papel importante, sobretudo favorecendo a instalação de programas genéticos e possibilitando a formação de bancos genéticos de espécies ameaçadas (HARVEY, 1982).

2.3 Criopreservação

A criopreservação de gametas de peixes tem sido estudada extensivamente nas últimas três décadas e a criopreservação de espermatozoides de cerca de 200 espécies de peixe foi alcançada com sucesso. No entanto, a criopreservação bem sucedida de embriões de peixe tem ainda de ser obtida principalmente devido à sua baixa permeabilidade da membrana,

tamanho grande, alto teor de lípidos, um córion espesso, estrutura complexa no início do desenvolvimento e uma elevada sensibilidade ao frio. As tentativas de criopreservar embriões de peixes foram realizadas em mais de 20 espécies de peixes. Embora os embriões tenham sobrevivido durante um curto período de tempo depois do arrefecimento a temperaturas abaixo de zero, a criopreservação de sucesso permanece indefinida (GODOY et al.;2011).

A criopreservação de oócitos oferece várias vantagens quando comparados com embriões de peixes, principalmente devido à ausência de um córion completamente formado. As relações entre estágio de desenvolvimento do oócito e lesão por congelamento foram encontradas para oócitos de várias espécies de mamíferos. Acredita-se que folículos ovarianos de primeiro estágio são geralmente mais resistentes à congelação e descongelação do que folículos de estágio antral. Folículos de primeiros estágios são menores em tamanho, resultando numa maior superfície em relação ao volume e, portanto, podem ser mais permeáveis à água e os solutos. (GODOY et al.;2011)

A criopreservação dos espermatozóides guarda apenas o genoma paterno e não é suficiente para preservar a diversidade genética que depende também do genoma materno. A criopreservação do genoma materno é importante já que vários fatores genéticos são herdados maternalmente pelo citoplasma do oócito tal como DNA mitocondrial e mRNAs que determinam as primeiras fases do desenvolvimento embrionário. A importância do germoplasma paterno e materno tem sido a base para as contínuas tentativas de desenvolver métodos para a criopreservação de gametas femininos de peixes. (GODOY et al.;2011)

A criopreservação de sêmen de peixes é uma técnica de grande interesse para a piscicultura que pode ser utilizada como rotina nos laboratórios de reprodução. O congelamento de células vivas pode ser feito basicamente de duas formas, pelo uso do gelo seco (neve carbônica ou dióxido de carbono sólido) ou do nitrogênio líquido. O gelo seco mantém as células na temperatura -79°C enquanto que o nitrogênio líquido permite a manutenção da temperatura a -196°C , sendo esse último o melhor meio para conservação de sêmen de peixe, e de outros animais, por longos períodos de tempo, facilitando inclusive sua identificação e diminuindo o risco de contaminação do material. O congelamento em gelo seco é feito pela colocação de pequenas porções de sêmen diluído, previamente resfriadas, diretamente sobre pequenos poços feitos no bloco de gelo seco, formando os chamados “pellets” de sêmen (CARNEIRO., 2007). Trata-se de uma metodologia pouco utilizada atualmente, porém que possibilitou a geração de muita informação sobre as particularidades de várias espécies anteriormente ao advento do nitrogênio líquido (BLAXTER, 1953). Na temperatura de criopreservação a

estrutura e funcionalidade de células e tecidos vivos são mantidas, conservando-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). O desafio para o sucesso dessa técnica está na retirada do excesso de água presente no interior da célula espermática, evitando assim a formação de cristais de gelo que podem causar danos funcionais irreversíveis (SALMITO-VANDERLEY; 2012).

Entre os benefícios da criopreservação de sêmen podemos citar: a eliminação do problema causado pela assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas; a simplificação do manejo dos reprodutores, podendo-se trabalhar separadamente com machos ou com fêmeas em momentos distintos; a facilidade de transporte de material genético entre pisciculturas, evitando o transporte de animais vivos e seus custos; a formação de bancos de germoplasma que permite a conservação de gametas de animais selecionados em programas de melhoramento ou manipulados e o estabelecimento de programas de hibridização utilizando peixes com períodos reprodutivos diferentes (VIVEIROS, 2005; MARIA et al., 2009).

Um dos primeiros relatos na literatura sobre o congelamento de sêmen de peixes no mundo foi realizado na década de 1950, apenas cerca de 30 depois o Brasil iniciou suas pesquisas na área (MARIA & CARNEIRO., 2012). Hoje no país, mais de 17 espécies de peixes já têm seu protocolo de criopreservação de sêmen determinado, com especial destaque para as famílias Characidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Pimelodidae (CAROSFELD et al., 2003; MARIA et al., 2009; VIVEIROS & GODINHO, 2009; VIVEIROS, 2011; ARAÚJO, 2011). O desenvolvimento de protocolos depende da padronização de métodos mais adequados de coleta e diluição, determinação de diluidores e crioprotetores mais eficazes, tipos de recipientes para armazenamento do sêmen e velocidades de resfriamento, congelamento e descongelamento específicas (MARIA & CARNEIRO., 2012).

Segundo Hunter (1982) fatores como a concentração de espermatozoides ou taxa de diluição; o tempo e temperatura de equilíbrio; a natureza da curva de resfriamento; a natureza da curva de descongelamento, dentre outros, são estresses sob quais os espermatozoides são submetidos durante o congelamento, que comprometem sua viabilidade pós-descongelamento. Porém uma das maiores dificuldades na congelação do sêmen é evitar a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, e o aumento da concentração de solutos (MATEOS-REX & AGUILLAR, 1996).

Isso ocorre porque quando os espermatozóides são submetidos a temperaturas abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelulares começam a se formar, resultando em aumento da

concentração de sais no líquido extracelular. Inicialmente a água do interior do espermatozoide não se congela, levando a perda de água para o meio extracelular, desidratando progressivamente o espermatozoide. Se a velocidade de congelamento é muito lenta, o aumento da concentração de sais intracelulares causada pela desidratação pode danificar o espermatozoide. Se a velocidade de congelamento for muito rápida, cristais de gelo intracelular podem se formar. A taxa de congelamento adequada é um equilíbrio entre esses fatores (MARIA & CARNEIRO., 2012).

Para minimizar a formação desses cristais durante o processo de criopreservação do sêmen, são adicionados diluidores que devem proporcionar proteção aos espermatozoides contra o choque térmico (SALMITO-VANDERLEY, 2010). Desta forma é importante o conhecimento da composição deste meio de congelamento, pois este é um fator determinante da qualidade seminal após o descongelamento, apesar de outros fatores também influenciarem o sucesso da criopreservação (MARIA & CARNEIRO., 2012).

A etapa de congelamento inicia-se após a coleta do sêmen com a adição do diluente, em seguida, o envasamento do sêmen diluído em palhetas ou criotubos, submetidos à diminuição de temperatura, até serem finalmente mergulhados e armazenado em nitrogênio líquido (NL) (MARIA & CARNEIRO., 2012).

A criopreservação de sêmen tornou-se uma ferramenta de auxílio à aqüicultura comercial, pois permite a possibilidade de selecionar reprodutores, desenvolver plantéis em programas de melhoramento genético (VERSTEGEM et al., 2002) e aperfeiçoar várias atividades através da obtenção de sêmen em tempos e locais diferentes. Embora a criopreservação tenha beneficiado a produção de pescado, estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após descongelamento (STREIT JR et al, 2009).

2.3.1 Danos causados pela preservação em baixas temperaturas

Em temperaturas criogênicas os níveis de energia cinética são demasiadamente baixos para permitir o movimento molecular (GROUT et al., 1990), e qualquer atividade biológica, incluindo reações bioquímicas que levariam ao envelhecimento e morte celular são efetivamente paralisadas (MAZUR et al., 1984). Entretanto, o próprio processo de criopreservação é associado com dano e até mesmo morte celular (GODOY., 2012)

Dois notáveis danos podem normalmente ser classificados após as células e os tecidos serem expostos a baixas temperaturas: lesão de refrigeração, que é usado para se referir ao dano após a exposição a baixas temperaturas, sem congelação e os danos de congelação (ZHANG et al., 2007).

Lesão de Refrigeração

Muitos tipos de células e tecidos são danificados quando resfriados a temperaturas próximas ou $<0^{\circ}\text{C}$, sem congelação. As lesões por refrigeração direta têm sido descritas com as seguintes características (MORRIS, 1987): todos os tipos de células podem ser consideradas sensíveis ao frio, desde que sejam arrefecidas de forma suficientemente rápida a uma temperatura suficientemente baixa, a viabilidade celular depende da taxa de arrefecimento, com mais lesões observadas após o resfriamento "rápido" ao invés do "lento", a lesão aumenta à medida que o período de incubação isotérmica a temperatura reduzida é estendido; perda da permeabilidade da membrana ocorre após resfriamento rápido, e, em alguns casos, pode ser revertido após o reaquecimento, e a resposta de qualquer tipo de célula pode ser modificada pelas condições de cultura, antes de arrefecimento ou pela adição de compostos específicos (ZHANG et al., 2007). As lesões sofridas incluem desnaturação de proteínas, alteração na fluidez das membranas celulares, peroxidação de lipídios e apoptose celular (GODOY.,2012).

Lesão de Congelamento

A água em estado líquido é essencial para a estrutura e funcionamento das células vivas, e a solidificação da água por congelação é geralmente destrutiva ou mesmo letal para as células. As lesões a que as células são expostas durante o congelamento irão resultar principalmente dos três aspectos seguintes (GROUT e MORRIS, 1987): os efeitos mecânicos dos cristais de gelo extracelulares na superfície das células, especialmente em tecidos com interconexões celulares, alterações nas propriedades físicas das soluções de fora da célula, incluindo a concentração de solutos que resultaria da nucleação de uma porção de água extracelular e o congelamento intracelular, caso ocorra (ZHANG et al., 2007)..

Quando a temperatura atinge o ponto de congelamento pode ocorrer a formação de cristais de gelo, no entanto as células e o seu meio envolvente normalmente permanecem descongeladas tanto por causa do super-resfriamento como pela depressão do ponto de congelamento causada pela adição dos solutos de proteção que estão freqüentemente presentes (ZHANG et al., 2007). O estado super-resfriado de um líquido resfriado lentamente ou de uma suspensão de células é caracterizado pela permanência de seus componentes no estado líquido em temperaturas abaixo do seu ponto de cristalização. O estado super-resfriado não é estável e qualquer perturbação pode levar a formação de cristais de gelo iniciando principalmente no meio extracelular (GODOY., 2012).

Uma das conseqüências mais fundamentais da presença de gelo no meio externo é o efeito sobre a composição da fração descongelada da solução extracelular. Um desequilíbrio entre o potencial químico entre a solução externa e a interna é resultado do aumento na concentração do soluto na solução extracelular à medida que a temperatura diminui e a fase de gelo cresce. A água super-resfriada das células tem, por definição, um potencial químico maior do que o da água na solução parcialmente congelada fora da célula, e em resposta a esta diferença de potencial, a água flui para fora da célula e congela externamente (MAZUR, 1984; TONER, 1993). Os eventos físicos seguintes na célula dependem da taxa de arrefecimento. Se o arrefecimento for suficientemente lento, a célula é capaz de perder água por osmose de forma rápida o suficiente para concentrar os solutos intracelulares, eliminar a super-refrigeração e manter o equilíbrio entre o potencial químico da água intracelular com o da extracelular. O resultado é que a célula desidrata e não congela intracelularmente. Se o arrefecimento for demasiado rápido, a taxa a que o potencial químico da água na solução extracelular diminui é muito mais rápido do que a taxa na qual a água pode difundir para fora da célula e o resultado final é a formação de gelo intracelular (MAZUR, 2004).

No entanto, se a taxa de resfriamento é muito lenta, as células terão o chamado "efeito solução" durante o congelamento, isto é, a exposição de células ao ambiente líquido hipertônico à medida que o gelo da solução cristaliza (MAZUR, 1965). Durante o resfriamento muito lento, as células serão expostas a condições hipertônicas extremas na fração de líquido residual por um período suficientemente longo para sofrerem danos antes de atingir as temperaturas ultra-baixas consideradas seguras e utilizadas para o armazenamento.(WATSON & FULLER, 2001).

2.3.2 Crioprotetores

Crioprotetor é qualquer aditivo que, quando fornecidos às células podem reduzir as injúrias causadas pelo congelamento e descongelamento; proporcionam, também, uma maior taxa de recuperação pós-descongelamento do que a obtida na sua ausência (KAROW JR.1969). Existem duas grandes categorias de agentes crioprotetores: crioprotetores permeáveis, por exemplo, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e propilenoglicol (PG), que são produtos químicos de baixo peso molecular e podem penetrar a membrana celular, e os crioprotetores não permeáveis, por exemplo, o hidroxietilamido, polivinilpirrolidona e vários açúcares, que são agentes de elevado peso molecular e não podem penetrar nas células (ZHANG et al., 2007).. Os crioprotetores de cada grupo têm papéis diferentes durante o arrefecimento e descongelamento. Os crioprotetores permeáveis produzem uma considerável depressão do ponto de congelação intracelular (SHEPARD et al., 1976) atuando como supressores da formação de cristais de gelo e levando sua ação protetora por todo o citoplasma e organelas. Além disso, esses crioprotetores promovem um tamponamento osmótico para as células durante o congelamento e descongelamento, atuando como solventes secundários de sais (PEGG, 1988). O efeito dos crioprotetores não permeáveis é baseado principalmente na desidratação das células antes do arrefecimento, o que resulta na redução da formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento. Alguns crioprotetores de alto peso molecular (> 50.000), tais como polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, e hidroxietilamido, protegem as células durante o congelamento e descongelamento, alterando a formação de cristais de gelo para um tamanho e forma inócua e formando uma espécie de revestimento da membrana plasmática através das moléculas destes polímeros, aumentando assim, a sua estabilidade (ZHANG et al., 2007). Enquanto agentes crioprotectores podem proteger as células vivas de grandes distorções da geometria celular e ambiental, uma variedade de crioprotetores podem por si mesmos ser prejudiciais para as células, especialmente quando utilizados em concentrações elevadas (FAHY, 1986; PEGG & ARNAUD, 1988). Segundo Fahy (1984; FAHY et al, 1990) a base para os efeitos prejudiciais de agentes crioprotetores não é simplesmente osmótica, mas devido a lesão "bioquímica" direta. Lesões, tais como a inativação ou desnaturação de enzimas específicas, a perturbação de bombas iônicas transmembrana, ou outras perturbações relacionadas com a estrutura e função celular, por consequência, são mais prováveis devido à interação direta do agente crioprotetor com proteínas e membranas biológicas.

2.3.3 Técnicas de criopreservação

Duas abordagens são utilizadas na criopreservação de materiais biológicos: o congelamento lento controlado e a vitrificação (ZHANG et al., 2007). A técnica de congelamento lento e controlado foi a primeira a ser desenvolvida e os seus procedimentos são caracterizados por: adição de concentrações molares de crioprotectores penetrantes, tais como DMSO, glicerol, ou outros agentes crioprotectores para a suspensão de células, e pelo uso de uma taxa de resfriamento pré-estabelecida a uma temperatura específica controladas por refrigeradores programáveis (ZHANG et al., 2007; GODOY.,2012)..

A vitrificação é a solidificação de um líquido provocada não por cristalização, mas por uma extrema elevação da viscosidade através dos crioprotetores durante o arrefecimento e a utilização de taxas ultra-rápidas de resfriamento. Durante a vitrificação a solução é tida como em estado vítreo, onde não há a formação de cristais de gelo. Células capazes de serem vitrificadas não precisam mais satisfazer as restrições clássicas de refrigeração ideal e as taxas de aquecimento, mas em vez disso podem escapar tanto das lesões por "efeito solução" quanto dos perigos de congelamento intracelular (FAHY et al., 1984).

2.3.4 Criopreservação de Esperma

Apesar das grandes diferenças que o sêmen de algumas espécies de peixes pode apresentar, a maioria das espécies apresenta características em comum, sendo a mais importante delas para o objetivo de armazenamento a ativação da motilidade pela água. Os espermatozoides não apresentam motilidade, isto é, não apresentam movimento quando estão dentro dos testículos. A fertilização dos óvulos somente ocorre após a ativação da motilidade dos espermatozoides que se dará após seu contato com a água. Normalmente a ativação é irreversível e a motilidade tem duração muito curta de tempo, após o qual o espermatozoide fica incapaz de fertilizar o óvulo (CARNEIRO.,2007).

As reservas energéticas do espermatozoide são exauridas rapidamente, sendo importante o conhecimento desse tempo para a espécie que está sendo trabalhada. Espermatozoides de salmão e truta nadam vigorosamente por menos de um minuto ao passo que outras espécies como tilápias, dourado e a Piracanjuba produzem sêmen que apresentam motilidade de alguns minutos (CARNEIRO.,2007). Algumas espécies tropicais nativas de

água doce de interesse econômico como o pintado, o corimbatá, o matrinxã, o piauçu e o pacu apresentam tempo muito curto de motilidade, excedendo pouco mais de um minuto (MARQUES, 2001).

Durante os procedimentos de desova em laboratório é comum a retirada dos gametas “a seco”, evitando o contato com a água. A adição da água é feita somente após a mistura dos gametas, aumentando com isso as chances dos espermatozóides fertilizarem os óvulos dentro do curto tempo em que permanecem ativos (CARNEIRO.,2007). Para o armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas, portanto, é importante que seu congelamento seja feito sem que ele seja ativado, sendo imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração (HARVEY e CAROLSFELD, 1993).

Em 1949, (POLGE et al. 1949) os espermatozoides de aves foram criopreservados com êxito utilizando glicerol como crioprotetor. A partir daí, a criopreservação de gametas masculinos tornou-se possível. Blaxter (1953) aplicou uma abordagem semelhante para os gametas de peixes e relatou sucesso com espermatozoides de Arenque, atingindo aproximadamente 80% da motilidade celular, após o descongelamento. Desde então, a criopreservação de espermatozóides de peixes tem sido estudada e bem sucedida em mais de 200 espécies (KOPEIKA et al 2007;. TIERSCH et al 2007; TSAI et al, 2010) . Técnicas de manejo de esperma foram estabelecidas para espécies de água doce e de peixes marinhos, incluindo a carpa, salmonídeos, catfish, ciclídeos, medakas, peixe-branco, pique, milkfish, garoupa, bacalhau e peixe-zebra (SCOTT & BAYNES, 1980; HARVEY & ASHWOOD-SMITH, 1982; STOSS & DONALDSON, 1983; BABIAK et al ., 1995; SUQUET et al 2000,; VAN DER STRATEN et al 2006; BOKOR et al.2007; TSAI et al 2010). Muitos estudos sobre a criopreservação de espermatozóides de peixes foram realizados em espécies de água doce de importância econômica, mas as tentativas de criopreservação de espermatozóides de espécies de peixes marinhos tendem a ser mais bem sucedidas (TSVETKOVA et al., 1996).

A principal técnica utilizada para o esperma de peixe é a de resfriamento lento e controlado (TSAI & LIN., 2012). Uma taxa de fertilização e eclosão de 95%, utilizando o esperma congelado-descongelado foi relatada para a carpa comum e estes resultados não são significativamente diferentes daqueles de esperma fresco (MAGVARV et al., 1996). O esperma de mais de 30 espécies de peixes marinhos foram criopreservados com êxito (SUQUET et al 2000; GWO 2000; VAN DER STRATEN et al 2006).

A escolha dos crioprotetores e a definição da velocidade de congelamento, simultaneamente, determinam a severidade dos danos físicos causados aos espermatozóides pela formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1977). Durante o congelamento os

principais danos às membranas espermáticas ocorrem entre -5°C e -15°C , que é faixa de formação dos cristais de gelo extracelular (MAZUR, 1984). No Brasil, a criopreservação de sêmen de peixes tem sido realizada em botijões de vapor de nitrogênio líquido tipo *dry shipper* que apresentam velocidades de congelamento entre -25 e $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e estabilização à -180°C em aproximadamente 3 minutos (TAITSON et al., 2007). O congelamento envolve perda de água e consequente desidratação celular (SQUIRES et al., 1999).

Etapas do processo de Criopreservação

A seqüência de eventos normalmente relacionados à criopreservação de sêmen de peixes envolve etapas como: 1. Coleta do sêmen; 2. Avaliação microscópica da qualidade seminal; 3. Adição de diluidores e crioprotetores; 4. Envase; 5. Congelamento e armazenamento; 6. Descongelamento; 7. Fertilização e acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larval. (MARIA & CARNEIRO; 2012)

Para obter sucesso na criopreservação de sêmen é necessário atenção nos procedimentos que antecedem o congelamento. A maioria das espécies de peixes estudadas no Brasil são migratórias e possuem espermatozoides imóveis dentro dos testículo. Durante a coleta de sêmen, problemas como contaminação com água, fezes ou urina podem ativar a motilidade espermática, situação indesejável para as amostras utilizadas no congelamento (MARIA & CARNEIRO., 2012).

A criopreservação envolve a diluição do sêmen em uma solução crioprotetora que deve conter um diluidor, um crioprotetor intracelular e um crioprotetor extracelular para permitir o armazenamento adequado (MARIA & CARNEIRO., 2012). Esses produtos garantem a não ativação dos espermatozóides durante o armazenamento e protegem as células espermáticas das chamadas crioinjúrias, danos celulares causados pela sua exposição a baixas temperaturas (SUQUET et al., 2000; BILLARD et al., 2004). Entre os diluidores mais conhecidos e utilizados com sucesso na criopreservação de sêmen de peixes nativos brasileiros podemos citar a solução de glicose, geralmente na concentração de 5% (MARIA & CARNEIRO., 2012). Entre os crioprotetores intracelulares temos o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metilglicol, que são adicionados aos diluidores em concentrações entre 5 e 10% (VIVEIROS & GODINHO, 2009; MARIA et al., 2009). A gema de ovo pode participar como um crioprotetor extracelular e, quando utilizada, é adicionada em concentrações entre 5 a 10% (MARIA et al., 2006; VIVEIROS & GODINHO, 2009; MARIA et al., 2011). No entanto, a

melhor combinação para uma espécie pode não resultar em respostas positivas para outras (MARIA & CARNEIRO., 2012). Como exemplo, as soluções crioprotetoras mais utilizadas nas espécies da família Pimelodidae são compostas por DMSO ou metanol e leite em pó ou lactose, utilizadas como crioprotetores intracelulares e extracelulares, respectivamente (CAROSFELD et al., 2003; ARAUJO, 2011). Na prática o desenvolvimento de uma solução crioprotetora para uma determinada espécie de peixe necessita de ensaios para a avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e sua influência sobre a integridade e funcionalidade da célula espermática. Tanto a escolha destas substâncias, quanto suas proporções na solução crioprotetora devem ser determinadas para cada espécie de peixe, sendo observadas diferenças muito grandes entre elas (MARIA & CARNEIRO., 2012).

Meios de Congelação (Diluidores e Crioprotetores)

O sêmen puro é praticamente impossível de ser congelado por causar danos à maioria dos espermatozóides, necessitando, portanto, da adição de soluções que mantenham a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura (PICKETT et al., 1987). Essa solução deve ser composta por uma substância para diluir e nutrir as células, e crioprotetores, para protegê-las contra o choque térmico (SALMITO-VANDERLEY.,2012) .

Condições mínimas são requeridas para um diluidor ser adequado, tais como: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática, pois a mesma pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização; 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 espermatozóides; esterilidade, ou seja, não devem vincular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas; proporcionar nutrientes como fontes de energia; além de aumentar o volume do sêmen (LEGENDRE & BILLARD, 1980). Porém cada grupo animal possui especificidade própria, tornado de vital importância para a criopreservação de sêmen que a composição do diluidor seja ajustada para as características seminais de cada espécie e a cada tecnologia seminal empregada (SALMITO-VANDERLEY.,2012).

Dentre os diluidores mais utilizados em testes de criopreservação de sêmen de peixes caracídeos, um dos mais conhecidos é a solução de glicose numa concentração de 5%, pois esta age como substrato de energia, componente osmótico e agente crioprotetor em função do

seu alto peso molecular, contribuindo para o equilíbrio osmótico e atuando como substituto de eletrólitos (HOLT, 2000).

Outro diluidor utilizado é o BTS (*Beeltsville Thawing Solution*, MINITUB), composto de glicose, citrato de sódio, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), bicarbonato de sódio, cloreto de potássio e sulfato de neomicina, que apresenta osmolaridade de 318 mOsm. Esse meio foi produzido, inicialmente, para a criopreservação de sêmen suíno, mas já vem sendo utilizado para outras espécies de animais (LAHNSETEINER et al., 1997; MARIA et al., 2004).

Também já foram testados a eficiências do diluidor seminal M III™ (Merck III) composto por glicose, citrato de sódio, EDTA, bicarbonato de sódio, e sulfato de gentamicina, de osmolaridade de 348 mOsm. Além destes, também já foi testado um diluidor conhecido como Ringer, composto de cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio hexahidratado, com 300 mOsm (SALMITO-VANDERLEY.,2012).

Uma das inovações mais recentes da biotecnologia do sêmen de peixe é a utilização de água de coco como diluidor para criopreservação, sendo este um meio natural e estéril composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, podendo exercer uma ação benéfica sobre a conservação celular (SALMITO-VANDERLEY.,2012). Trabalhos realizados por Nunes (1987) demonstraram a viabilidade da água de coco como diluente de refrigeração e congelamento do sêmen caprino, o que levou à elaboração de um meio comercial de conservação, padronizado e estabilizado, à base de água de coco em pó (ACP®). Tornando-se, desta forma, mais uma alternativa mercadológica para a área de diluidores tradicionais (SALMITO-VANDERLEY.,2012).

Outra função importante do diluidor é servir como carreador de crioprotetores, substâncias que têm como função proteger os espermatozoides contra os efeitos nocivos do congelamento (SALMITO-VANDERLEY.,2012). Toda essa proteção ao espermatozoide é essencial, pois durante os processos de congelamento-descongelamento os espermatozoides são submetidos a condições desfavoráveis como: a desidratação, as mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, o efeito solução e a formação de cristais de gelo (PARKS & GRAHAM, 1992; VIVIEROS et al, 2011). A consequência imediata destes processos é a ruptura da membrana plasmática devido aos estresses térmico, mecânico, químico e osmótico exercidos sobre a célula durante o congelamento (SALMITO-VANDERLEY.,2012).

Aparentemente, determinados meios de congelação agem melhor em determinadas espécies do que em outras. Assim, para se estabelecer um protocolo ideal de congelação de sêmen de uma determinada espécie, vários testes devem ser realizados a fim de encontrar a melhor associação entre diluidor e crioprotetores, formando um meio de congelação ideal para a espécie em estudo (SALMITO-VANDERLEY.,2012). Uma possível explicação para o fato de que determinados diluentes podem agir de formas diferentes dependendo da espécie estudada é a existência de diferenças na composição lipídica da membrana plasmática de espermatozoides entre espécies e ainda entre indivíduos da mesma espécie. Assim um mesmo meio de congelamento pode conferir maior ou menor proteção aos espermatozoides (HOLT., 2000).

Taxas de Congelamento e Descongelação

Durante os anos 1980 e 1990, o congelamento de esperma de espécies Brasileiras era feito com gelo seco ou vapor de nitrogênio (N₂), respectivamente, como pequenos pellets em buracos de gelo seco ou em palhetas colocadas a alguns cm (1-13) acima da superfície de N₂ em uma caixa de poliestireno, embora os espermatozóides tenham sobrevivido ao processo de criopreservação, a técnica de pellet e congelamento em uma caixa de poliestireno foram utilizadas apenas em algumas experiências (VIVEIROS & GODINHO., 2009). A criopreservação de esperma de peixes brasileiros foi expandida com base em uma tecnologia simples, que consiste na utilização de extensores simples e dispositivos criogênicos portáteis conhecidos como dry-shippers (HARVEY, 2000). Dry-shippers são recipientes de vapor de N₂ onde o esperma, carregado em palhetas (0,25, 0,5 ou 4,0 ml), é submetido a uma taxa de arrefecimento de cerca de 25-40° C min⁻¹ a uma estabilização gradual a -181° C em 3 minutos (TAITSON et al. 2007). As palhetas permanecem por horas ou dias no dry-shipper antes do armazenamento em N₂ líquido. Em geral, as células congeladas a taxas de resfriamento rápidas, como em dry-shippers, são descongelados rapidamente em um banho-maria a 30-60° C por 8-60 s (VIVEIROS & GODINHO., 2009).

Avaliação de Espermatozóides Após o Descongelamento

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm tentado adicionar soluções criodiluidoras ao sêmen, também conhecidas como meios de congelação ou diluidores, com a finalidade de manter a viabilidade espermática pós-descongelado (SALMITO-VANDERLEY., 2012). O descongelamento implica na reidratação das células provocada por um influxo de água (HOLT, 2000). Com exceção das células embrionárias de mamíferos, a maioria das células suporta o descongelamento rápido, mesmo que não seja atingida totalmente a sua reidratação (MARIA & CARNEIRO., 2012). A rapidez no descongelamento é necessária para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo que podem ser letais à célula (LEUNG, 1991).

O descongelamento uniforme do sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL geralmente é obtido após sua imersão em água quente (30-60°C) por poucos segundos (3-8 s). Em recipientes maiores este processo de descongelamento se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rápido que a porção central (MARIA & CARNEIRO., 2012). Portanto, a determinação da velocidade de descongelamento também é primordial para o estabelecimento de protocolos de conservação de sêmen (MAZUR, 1984; WATSON, 1995).

Os Espermatozóides pós-descongelamento são avaliados na maior parte das vezes através da porcentagem de motilidade observada num microscópio de luz, este método de avaliação é subjetivo, mas com alguma prática, pode ser bastante preciso. Na maioria das espécies estudadas, a motilidade espermática pós-descongelamento foi observada acima de 60%, variando de acordo com o protocolo de congelação utilizada. Durante a última década, a utilização de uma análise de esperma assistida por computador (C.A.S.A.) tornou-se mais popular na Europa e laboratórios dos EUA. Contudo, esta tecnologia só recentemente foi introduzida no Brasil, sem resultados disponíveis ainda (VIVEIROS & GODINHO., 2009).

A porcentagem de espermatozóides vivos também tem sido usada como uma ferramenta para avaliar a qualidade dos espermatozóides pós-descongelamento por pesquisas brasileiras (VIVEIROS & GODINHO., 2009). Os espermatozóides são corados em eosina-nigrosina (BLOM 1950) e vistos em um microscópio de luz. Esta técnica pode ser utilizada para confirmar os resultados obtidos com a avaliação subjetiva de motilidade espermática, os resultados são, com bastante frequência, semelhantes (MARIA et al. 2006). Mais recentemente, a utilização de corantes fluorescentes tal como o iodeto de propídio e SYBR 14

se tornou mais popular em laboratórios europeus e nos EUA, pois eles podem ser usados em combinação com a citometria de fluxo (VIVEIROS & GODINHO., 2009).

Segundo VIVEIROS & GODINHO (2009) o pós-descongelamento de espermatozoides de espécies brasileiras rendeu um taxa de fertilização, variando de 31% em *B. amazonicus* para 100% para *P. lineatus*, em relação ao controle. É importante observar que, quando o esperma descongelado é testado para a fertilidade, outra fonte de variação é acrescentada: a qualidade dos ovos. Um controle da qualidade do ovos, como fertilizar um lote de ovos com esperma fresco, deverá sempre ser adicionado em um ensaio de fertilização para assegurar que nenhuma baixa taxa de fertilização em lotes de ovos fertilizados com espermática descongelado foi realmente causada pelo processo de congelamento, ao invés de má qualidade dos ovos. Recentemente, as taxas de fertilização de ovos de *P. lineatus* fertilizados com espermatozoides pós-descongelamento dos mesmos machos foram relatadas como sendo tão elevadas como 83% ou tão baixo como 47%, dependendo da fêmea (VIVEIROS et al. 2008). Além disso, a qualidade dos ovos diminui rapidamente após a desova. A dificuldade de controlar a qualidade dos ovos durante os ensaios de fertilização é uma das razões pelas quais a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento é avaliada principalmente em termos de motilidade e percentagem de espermatozoides vivos (VIVEIROS & GODINHO., 2009).

Semelhante a outras espécies de peixes, estudos realizados em Characiformes avaliaram os efeitos da criopreservação sobre a motilidade espermática (subjetivamente ou usando CASA), vitalidade, função mitocondrial, e taxas de fertilização e a maioria reporta uma redução moderada em pelo menos um destes parâmetros, em comparação com o esperma fresco (VIVEIROS; ISAÚ & LEAL., 2012).

No estudo realizado por VIVEIROS; ISAÚ & LEAL (2012) a motilidade dos espermatozoides de *B. insignis* subjetivamente avaliados diminuiu de 100% de espermatozoides móveis e uma pontuação de qualidade de 5 do esperma fresco para 54% de espermatozoides móveis e um índice de qualidade de 3 em esperma descongelado.

Este estudo demonstrou que a porcentagem de espermatozoides móveis e o score da qualidade da motilidade diminuíram significativamente após a criopreservação. Entretanto, o desenvolvimento dos embriões e larvas que foram originados do esperma criopreservado era similar aos da progênie originada de esperma fresco, com base nestes achados, o esperma criopreservado pode ser usado como ferramenta para restaurar a população de espécies ameaçadas, como *B. insignis*, assim como para os propósitos da aquicultura, sem preocupação com a qualidade da prole (VIVEIROS; ISAÚ & LEAL., 2012).

Quadro 01: Escala de 0 a 5 associada à taxa de motilidade espermática utilizada por Fribourg (1966).

Escala	Taxa de motilidade espermática (%)
0	Sem motilidade
1	10 – 20 %
2	20 – 40 %
3	40 - 60 %
4	60 - 80 %
5	> 80 %

Fonte: SOUZA (2010, pg. 05)

Capacidade fertilizante do sêmen pós-descongelamento

Embora a motilidade e, em menor frequência, a morfologia espermática sejam usadas como critério de qualidade do sêmen, nem sempre representam um bom indicativo da capacidade de fertilização (LEITE., 2011). Portanto, o teste de fertilização constitui o método que melhor permite avaliar a qualidade seminal, sobretudo do sêmen congelado, pois avalia as condições do sêmen *in vivo* (RANA e MACANDREW 1989).

No caso de sêmen criopreservado, a proporção de espermatozoides por ovócito é geralmente superior à utilizada para o sêmen fresco devido a diminuição da qualidade espermática após o descongelamento (LEITE., 2011). VIVEIROS et al. (2009) observaram que a proporção ideal de espermatozoides pós-descongelamento por ovócito foi 20,5 vezes superior à proporção ideal para sêmen fresco em *Salminus brasiliensis* (1,4x10⁵ espermatozoides/ovócito para o sêmen fresco versus 28,7 x 10⁵ espermatozoides/ovócito para sêmen descongelado). MARIA (2005) utilizou uma proporção 10 vezes maior em relação ao sêmen fresco de *Brycon orbignyianus* (4,6 x 10⁵ espermatozoides/ovócito para o sêmen fresco versus 46 x 10⁵ espermatozoides/ovócito para o sêmen descongelado). Por outro lado, alguns pesquisadores afirmam que o excesso de espermatozoides para fertilização encobre a qualidade dos espermatozoides criopreservados, dificultando as comparações entre protocolos (VIVEIROS et al., 2000). No caso de sêmen descongelado com motilidade semelhante à do sêmen fresco, alguns autores utilizam a mesma proporção de espermatozoides/ovócito tanto para o sêmen fresco quanto para o descongelado (VIVEIROS et al., 2010).

Outros fatores como a qualidade dos ovócitos, o método de fertilização artificial, o meio de ativação utilizado, entre outros, podem interferir nos resultados das taxas de

fertilização, portanto estas variáveis devem ser controladas nos estudo de avaliação da capacidade fertilizante do sêmen descongelado (LEITE, 2011).

2.3.5 Criopreservação de Embriões

A criopreservação de embriões tornou-se parte integrante da reprodução assistida. A criopreservação bem sucedida de embriões é importante porque a biodiversidade de ambos os genomas paterno e materno será preservada. Embora as técnicas de criopreservação para os embriões de mamíferos tenham sido amplamente estabelecidas, a criopreservação bem sucedida de embriões intactos de peixe ainda não foi alcançada (TSAI & LIN., 2012). Fatores limitantes para a criopreservação de embriões de peixes incluem seus sistemas biológicos multicompartimentais, alta sensibilidade ao frio, baixa permeabilidade da membrana e seu grande tamanho, o que leva a uma baixa área de superfície em relação ao volume (ZHANG e RAWSON 1995). O efeito de tal proporção é uma redução da velocidade em que a água e os crioprotetores podem se mover para dentro e para fora do embrião durante a criopreservação (MAZUR 1984). Embriões de peixes são osmoregulados, eles são liberados para o meio externo e ativado, em seguida, o envelope vitelínico se separa da membrana plasmática e forma o córion (TSAI & LIN., 2012). Estudos sobre a permeabilidade do córion de embriões de peixe zebra mostrou claramente que ele era permeável aos eletrólitos e uma gama de crioprotetores, incluindo propano-1,2-diol, metanol, DMSO, etileno (ZHANG e RAWSON 1996). A estrutura do córion desempenha um papel crucial como filtro flexível para o transporte de alguns materiais (Toshimori e Tsuzumi 1976) e protege contra microorganismos (SCHROOTS et al. 1982) Estudos em embriões de peixe zebra mostraram que a permeabilidade da membrana plasmática em diferentes fases de desenvolvimento da água manteve-se relativamente estável (TSAI & LIN., 2012). A permeabilidade ao metanol (crioprotetor) pareceu diminuir durante o desenvolvimento embrionário (ZHANG e RAWSON 1998). Isto também indica que houve uma redução gradual na permeabilidade após a fertilização em embriões de peixe zebra, ao contrário da crença generalizada de que a permeabilidade da membrana de embriões de peixes reduz rapidamente ao mínimo pouco tempo depois da fertilização (Alderdice 1988).

Os estudos sobre a cinética das lesões de arrefecimento abaixo de zero em embriões de *Drosophila* (MAZUR et al. 1992) e sensibilidade de refrigeração de embriões de peixe zebra têm demonstrado que a lesão de arrefecimento desempenha um papel importante na redução

da sobrevivência do embrião durante a exposição a temperaturas abaixo de zero (ZHANG e RAWSON 1995 ; HAGEDORN et al 1997). A sensibilidade ao frio foi demonstrada para muitas espécies e tem sido analisada em embriões de peixes, incluindo a truta marrom (*Salmo trutta* f. *Fario*) (MADDOCK, 1974), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (HAGA 1982), carpa (*Cyprinus carpio*) (Dinnyes et . al 1998), Fathead minnow (*Pimephales promelas*) (CLOUD et al 1988), Peixe-dourado (*Carassius auratus*) (LIU et al 1993) e peixe-zebra (*Danio rerio*) (ZHANG e RAWSON 1995; ZHANG et al 2003). A alta sensibilidade de refrigeração de embriões de peixes, especialmente nas fases iniciais, grande tamanho das células, a estrutura complexa da membrana e a sua baixa permeabilidade são os principais obstáculos para alcançar o sucesso da criopreservação destes embriões (ZHANG e RAWSON 1996).

A toxicidade ao crioprotetor segue um padrão semelhante a sensibilidade de refrigeração com fases posteriores sendo menos sensíveis ao crioprotetor (ZHANG et al 2005,. ZHANG et al 1993,. LIU et al, 1993;. SUZUKI et al 1995.). Vários estudos têm determinado a permeabilidade da membrana para embriões de peixe zebra (ZHANG e RAWSON 1998; HAGEDORN et al 1997) e a permeabilidade da membrana à água e a maioria dos crioprotetores foi mostrada como sendo baixa (ZHANG e RAWSON 1996; ZHANG e RAWSON 1998). Estudos sobre a criopreservação de embriões de peixe zebra demonstraram 8% de sobrevivência do embrião em metanol 2M à temperatura de -25 ° C, no entanto, não foi observada a sobrevivência dos embriões quando congelados a -30 ° C ou temperatura inferior (ZHANG et al 1993.).

Embora a criopreservação dos embriões não tenha sido plenamente alcançada, progresso considerável tem sido alcançado no entendimento das condições exigidas para a criopreservação de embriões de peixes e isso irá ajudar no desenvolvimento de um protocolo de sucesso no futuro (TSAI & LIN., 2012).

2.3.6 Criopreservação de Oócitos

A criopreservação de oócitos é potencialmente a melhor maneira de preservar a fertilidade feminina. A criopreservação de oócitos de peixe tem sido estudada e oferece várias vantagens, tais como: tamanhos menores, menor conteúdo de água e ausência de córion totalmente desenvolvido, o que permite uma permeabilidade à água e aos solutos superior no oócito do que no embrião (TSAI & LIN., 2012). Embriões de peixe são muito grandes para

aplicar o protocolo de criopreservação tradicional. Oócitos imaturos podem ser uma alternativa aos ovos maduros devido ao seu tamanho menor (HAGEDORN et al. 1996). No entanto, não há nenhuma técnica prática disponível para induzir o oócito em fase inicial para amadurecer in vitro. Atualmente, os oócitos em fase final não podem ser criopreservados com êxito porque o seu tamanho ainda não é suficientemente pequeno para resultar em uma menor área de superfície em relação ao volume, estes fatores reduzem a taxa em que a água e o crioprotetor se movem para dentro e fora dos oócitos durante a criopreservação. Desenvolver os métodos para criopreservação de oócitos requer a triagem de potenciais tratamentos crioprotetores, avaliação da tolerância ao frio, determinação da taxa apropriada para congelar a temperaturas criogênicas e taxa de descongelamento (TSAI & LIN., 2012). Métodos de avaliação rápida da viabilidade de oócitos foram desenvolvidos com azul de tripano (TB), diacetato de fluoresceína (FDA) + iodeto de propídio (PI) e trifosfato de adenosina (ATP). (PLACHINTA et al 2004,. ZAMPOLLA et al. 2006; Guan et al 2008;. TSAI et al.2008; TSAI et al 2009;. TSAI et al 2011;) Um ensaio funcional baseado na maturação in vitro, seguida pelo colapso da vesícula germinal (GVBD), também tem sido demonstrado eficaz para a fase tardia de oócito de II estágio (PLACHINTA et al. 2004).

A permeabilidade da membrana do oócito do peixe-zebra a água e crioprotetores tem sido estudados (ZHANG et al. 2005) e foi demonstrado que a permeabilidade da membrana decresce com a temperatura. Estudos sobre a sensibilidade do oócito do peixe-zebra a refrigeração mostrou que os oócitos eram muito sensíveis ao frio e sua sobrevivência decrescia com a diminuição da temperatura (ISAYEVA et al., 2004).

Guan et al. (2008) mostrou que, embora a viabilidade de oócitos obtidos imediatamente após a congelação-descongelação tenha sido relativamente elevada, com 88%, utilizando a coloração de TB; a viabilidade do oócito diminuiu para 29,5%, após 2 horas de incubação a 22 ° C. O estudo mostrou ainda que o nível de ATP nos oócitos diminuiu significativamente após o descongelamento e todos os oócitos tornaram-se translúcidos. Aparentemente, a razão ADP / ATP poderia ser uma medida valiosa de lesão celular após período de incubação pós-descongelação, pois reflete o metabolismo e o estado de energia da população, bem como indicando alguma medida do potencial de reparação (TSAI & LIN., 2012).

Alta sensibilidade de refrigeração (TSAI et al. 2009) e baixa permeabilidade da membrana (Guan et al. 2.008) de oócitos peixe-zebra são os principais obstáculos para o desenvolvimento de um protocolo de sucesso para sua criopreservação já que a sensibilidade

ou choque pelo frio pode dificultar os processos de resfriamento lento. A vitrificação pode ser outra opção para alcançar criopreservação de sucesso para os oócitos (TSAI & LIN., 2012).

2.4 Conservação de recursos genéticos no Brasil

Atualmente, as coleções de DNA ou de tecidos biológicos, tais como nadadeiras, sangue e músculo, são comuns nos principais Museus de História Natural ou de Zoologia nos EUA e Europa. No Brasil, está é uma atividade recente, sobretudo em coleções ictiológicas.

Os bancos de germoplasma tem a função de identificar a diversidade genética de populações naturais, visando a conservação de recursos genéticos e direcionamento do uso destes recursos em sistemas de produção. Com isso, a formação de um banco de amostras de DNA na Embrapa Pesca e Aquicultura tem por objetivo, identificar taxonomicamente as espécies com potencial zootécnico e auxiliar na conservação das espécies nativas da bacia Araguaia-Tocantins. (BARROSO et al; 2013)

A domesticação de espécies de peixes para o cultivo em sistemas de produção é uma das formas mais importantes de exploração da biodiversidade. Entretanto, estudos mostraram que apenas 36 espécies de peixes amazônicos são exploradas comercialmente, seja para produção ou como ornamentais, entre eles os mais conhecidos são o tambaqui, matrinhã, pirapitinga, pirarucu, piaui, curimatã, surubins, oscar, neons e arraias. (BARROSO et al; 2013)

Quadro 02: Lista de espécies pertencentes ao banco de amostras de DNA da bacia Araguaia Tocantins

Ordem	Família	Espécie	Popular	N
Beloniformes	Belontiidae	<i>Pseudotilapia micropis</i>	Espadinha	20
Characiformes	Ctenopomidae	<i>Boulengerella cuvieri</i>	Bicuda	1
	Cynodontidae	<i>Hydrolycus cf. armatus</i>	Cachorra	3
		<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	Cachorra	5
	Hemiodontidae	<i>Hemiodus microlepis</i>	Cruzeiro do sul	1
		<i>H. unimaculatus</i>	Cruzeiro do sul	5
	Bryconidae	<i>Salminus icquitensis</i>	TabaRANA	2
		<i>Brycon pesu</i>	Matrinchã	2

	Acestrorhynchidae	<i>Acestrorhynchus microlepis</i>	Peixe cachorro	6
	Anostomidae	<i>Shizodon vittatus</i>	Piau pororoca	1
		<i>Anostomidae sp.</i>	Papa terra	3
		<i>Leporinus cf. trifasciatus</i>	piau	2
		<i>L. sp.</i>	Piau	1
	Curimatidae	<i>Curimata acutirostris</i>	Curimba	4
	Prochilodontidae	<i>Semaprochilodus brama</i>	Jaraqui	11
		<i>Semaprochilodus insignis</i>	Jaraqui	201
		<i>Prochilodus nigricans</i>	curimba	4
	Serrasalminidae	<i>Myloplus sp.</i>	Prata 1	3
		<i>M. torquatus</i>	Prata 2	3
		<i>Myleus setiger</i>	Rabo vermelho	18
		<i>Serrasalmus cf. maculatus</i>	Piranha	3
		<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	250
		<i>Piractus brachypomus</i>	caranha	135
		<i>P. mesopotamicus</i>	pacu	5
	Characidae	<i>Agoniatès haesinus</i>	Apapá	2
		<i>Roeboides affinis</i>	Cachorro	9
		<i>Tetragonopterus chalceus</i>	pataca	3
		<i>Triporthes albus</i>	Sardinha	12
	Erythrinidae	<i>Erythrinus erythrinus</i>	jeju	2
		<i>Hoplias malabaricus</i>	Traíra	7
		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	Jeju	2
Clupeiformes	Pristigasteridae	<i>Pellona flavipinis</i>	Apapá/ Dorada	2
		<i>Pristigaster cayana</i>	Borboleta	8
	Engraulidae	<i>Lycengraulis batesi</i>	Sardinha prata	7
Osteoglossiformes	Arapaimidae	<i>Arapaima gigas</i>	pirarucu	31
	Osteoglossidae	<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	Aruaná	3
Perciformes	Cichlidae	<i>Geophagus sveni</i>	Cara	15
		<i>G. aff. Altifrons</i>	cará	1
		<i>Ciclha piquiti</i>	Tucunaré azul	2
		<i>C. Kelberi</i>	Tucunaré amarelo	2

		<i>C. sp.</i>	Tucunaré	41
		<i>Astronotus ocellatus</i>	oscar	10
		<i>Geophagus neambi</i>	cara	1
		<i>Ciclhassoma araguaense</i>	cará	2
		<i>Mesonauta cf. acora</i>	Acará festivo	4
	Sciaenidae	<i>Plagiosum squamosissimus</i>	curvina	5
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus sp.</i>	casculo	1
		<i>H. sp.</i>	Cascudo	8
		<i>Baryancistrus niveatus</i>	casculo	6
		<i>Glyptoperichthys joselimaianus</i>	Cascudo abacaxi	1
	Pimelodidae	<i>Pimelodina flavipinis</i>	Mandi moela	9
		<i>Hypophtalmus marginatus</i>	Mapará	15
		<i>Hassar wilderi</i>	Mandi cabeça ferro	2
		<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	Cachara amazonica	88
		<i>P. reticulatum</i>	Cachara pantanal	90
		<i>P. tigrinum</i>	surubim	20
		<i>P. corruscans</i>	pintado	9
		<i>Leiarius marmuratus</i>	jundia	19
		<i>Surubim lima</i>	jurupessem	6
		<i>S. tigonocephalus</i>	jurupessem	5
		<i>Hemisurubim platyrhyncus</i>	jurupoca	2
		<i>Zungaro zungaro</i>	jau	3
	Doradidae	<i>Oxydoras niger</i>	Cuiu-cuiu	10
		<i>Pterodoras granulosus</i>	Armado	6
		<i>Platydoras armatulus</i>	Armado amarelo	5
		<i>Rhinodoras cf. dorbignyi</i>	Armado preto	4
	Auchenipteridae	<i>Auchenipterus nuchalis</i>	Bagre	8
	?	<i>Hypothinemus mentalis</i>	?	1
Total				118

Fonte: Barbosa et al (2013, pg.180)

Atualmente a Embrapa tem como objetivo montar um banco ativo de germoplasma (BAG) com espécies de peixes nativas do Brasil e este projeto terá auxílio das comunidades de pescadores. O trabalho de captura dos animais será executado por pescadores na bacia dos rios Tocantins e Araguaia. Os animais serão mantidos vivos e em boas condições para serem recolhidos pelos pesquisadores da Embrapa. Participam, até o momento, duas comunidades de municípios tocantinenses, Miracema e Ipueiras (EMBRAPA., 2013)

Será o primeiro banco formado por peixes vivos da Embrapa e servirá a pesquisas e também para preservar os recursos genéticos dessas espécies, o que é importante para subsidiar programas de melhoramento genético, prospecção de genes, repovoar ambientes naturais, melhorar a qualidade dos plantéis públicos e privados, entre outros usos (EMBRAPA., 2013).

O BAG de Palmas vai complementar os bancos da Embrapa Pantanal, em Corumbá (MS), e da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju (SE), que possuem bancos de sêmen de peixes nativos. Ainda não há como congelar embriões de peixes, como se faz na bovinocultura, o que torna os bancos com exemplares vivos ainda mais importantes. Com o objetivo principal de preservar os recursos genéticos das espécies de peixes nativos, o BAG da Embrapa Pesca e Aquicultura manterá três tipos de repositório. Um deles será de peixes vivos de diferentes espécies e localidades. O segundo é uma coleção de DNA de peixes nativos que já conta com cerca de duas mil amostras preservadas e, por fim, haverá um estoque de sêmens criopreservados (EMBRAPA, 2013).

O BAG de peixes nativos de Palmas também fará parte do novo Sistema de Informação de Recursos Genéticos Animais dentro da Plataforma Alelo da Embrapa, cujo objetivo é criar uma rede de gestão da informação de Recursos Genéticos Animal por meio da informatização das atividades relacionadas a este fim (EMBRAPA, 2013).

O BAG da Embrapa Pesca e Aquicultura será composto por diversas espécies de importância comercial como tambaqui (*Colossoma macropomum*), caranha (*Colossoma brachypomus*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* e *P. punctifer*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e matrinxã (*Brycon gouldingi*), além de espécies brasileiras a serem preservadas como a pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*), piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), jaú (*Zungaro jahu*), barbado (*Pinirampus pirinampu*), entre outras (EMBRAPA, 2013).

No Brasil também existe o Banco de sêmen de peixes do Pantanal. A pesca no Pantanal Sul vem sendo monitorada desde 1994 pelo Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul – SCPESCA/MS, desenvolvido pela Embrapa Pantanal em parceria com a Fundação de Meio Ambiente Pantanal-MS e com a Polícia Ambiental-MS. Juntamente com esse sistema, foram realizados outros estudos na Embrapa Pantanal sobre os tamanhos e idade de primeira maturação sexual dos peixes e época de reprodução das principais espécies da região. Esses conhecimentos foram aplicados na legislação de pesca, definindo, assim, os tamanhos mínimos de captura, a época de defeso da reprodução - piracema, bem como as cotas de captura de pescado para os pescadores esportivos (RESENDE., 2013).

Para complementar esses estudos e fortalecer o suporte científico obtido em anos de pesquisas, a Embrapa Pantanal vem implantando novas tecnologias para o estudo das características genéticas das principais espécies exploradas. Entre essas tecnologias encontra-se o Banco de Sêmen. O processo de congelamento de sêmen de peixes iniciou-se no ano de 2000 e atualmente contém sêmen congelado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), piraputanga (*Brycon hilarii*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), provenientes dos rios Taquari e Miranda. Esse banco de sêmen de peixes do Pantanal encontra-se na Embrapa Pantanal, localizada em Corumbá, Mato Grosso do Sul (RESENDE., 2013).

Até 1983, o Programa de Pesquisa em Recursos Genéticos coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia incluía apenas a conservação de espécies vegetais (MARIANTE., 2011). A partir daquele ano, foi iniciada a Conservação de Recursos Genéticos Animais, com o Banco de Germoplasma Animal (BGA), cujas primeiras amostras foram coletadas da raça Mocho Nacional, da qual – tinha-se notícia – restavam apenas três touros e oito vacas, a partir de então, animais de outras raças/espécies foram incluídos, sendo criada uma Rede de Conservação de Recursos Genéticos Animais que, a partir do Programa Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos, incentivou a formação de núcleos de conservação *in situ* em diferentes unidades da Embrapa, universidades, empresas estaduais e criatórios particulares (MARIANTE., 2011).

Este valioso material genético poderá vir a ser utilizado para: restabelecer uma raça extinta; desenvolver de um novo grupamento genético; dar suporte a programas de conservação *in vivo*; e fornecer material para estudos moleculares visando à identificação de genes de importância econômica (RAMOS et al., 2009).

CONCLUSÃO

Os Bancos de Germoplasma são ferramentas essenciais para a preservação de espécies ameaçadas, assim como para o desenvolvimento e manutenção da diversidade da piscicultura no Brasil.

A criopreservação seminal em peixes vem avançando e mostrando sua importância para os programas de reprodução de peixes, porém ainda não há uma padronização nos protocolos de criopreservação. Dessa forma, pode-se encontrar na literatura uma grande variação nos diluidores utilizados na criopreservação de sêmen de um mesmo grupo de animais. Outros fatores, além dos diluidores, também exercem influência sobre a qualidade do sêmen criopreservado, por isso é muito importante que o estudo sobre as particularidades do sêmen das diferentes espécies de peixes e a busca da padronização da técnica de criopreservação continue.

A criopreservação de gametas e embriões já são rotineiramente aplicadas em espécies de mamíferos, no entanto, a criopreservação de embriões e ovócitos continuam a ser um grande desafio em espécies aquáticas e necessitam de mais estudos pois o genoma materno é de grande importância para a manutenção da diversidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENDA 21. Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, Brasília, 2000, 598p.

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO-JR, H.F. (1999) Peixes da bacia do alto Paraná. In: LOWEMcCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Trad.: Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A.A.; Cunningham, P.T.M. São Paulo: **Edoosp**, p. 374-399.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C.. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. MEGADIVERSIDADE | Volume 1 | Nº 1 | Jul 2005 **Departamento de Biologia. Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupelia)**. Universidade Estadual de Maringá. Paraná, Brasil.

ALDERDICE, D.F. Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. In: **Fish Physiology**, Editor. W.S. Hoar, D.J. Randall. Academic Press, San Diego, 1988. p. 163-251.

ARAÚJO, R.V. Motilidade, Velocidade e Fertilidade do sêmen de Surubim-do-paraná *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores. 91p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Lavras, MG, 2011.

ASHWOOD-SMITH, M. J. & FARRANT, J. (Eds) (1980): Low temperature preservation in medicine and biology. Tunbridge Wells: Pitman Medical.

BABIAK, I.; GLOGOWSKY, J.E; SZUMIEC, J; ADAMEK, J. Cryopreservation of sperm of common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Res.* 1995; 28: 567- 571.

BALLOU J. D. Potencial contribution of cryopreserved germplasm of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, New York, v. 29, p. 19-25. 1992.

BARBOSO, A. da S.; SILVA, L. R.; BARROS, V. M.; OLIVEIRA, A. da S.; ALVEZ, M. S. S.; VARELA, E. S.; HASSIMOTO, D.T. & ALVEZ, A.L. [17] Implantação do banco de DNA de peixes da bacia Araguaia-Tocantins: Aplicações na taxonomia, produção e conservação de recursos genéticos In: *Revista Integralização Universitária – RIU*. Faculdade Católica de Tocantins. Palmas: v. 7, n. 9, p.180-181.

BARROSO, H. G.; SOUSA, A. P. Áreas potenciais para a aquicultura sustentável na bacia do rio itapecuru: bases para o planejamento com uso do sistema de informação geográfica. *Rev. Bras. Enga. Pesca* 2(1), jan. 2007.

BILLARD R.J.; COSSON, S.B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, v. 236, p.1-9, 2004.

BLAXTER J.H.S. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, v.172, p.1189-1190, 1953.

BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertil Steril*, 1950, 1(2):176–177

BOKOR, Z.; MÜLLER, T; BERCSÉNYI, M; HORVÁTH, L.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, A. Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). *Acta. Biol. Hung.* 2007; 58(2): 199-20.

BÜTTOW, M. V.; **Sistematização dos bancos ativos de germoplasma da Embrapa clima temperado em um sistema gerenciador de banco de dados georreferenciado.** 2005. Monografia (Programa de Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

BYRNE, Jeffry. Microsoft Access 97. Rápido e fácil para iniciantes. Rio de Janeiro: Campus. 1997. 254 p.

CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, L.; RANA, K.J.; HERRAEZ, M.P. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 1998;37:245–53.

CALLISTO, M. & GONÇALVES, J.F.Jr. 2002. A vida nas águas das montanhas. *Ciência Hoje* 31 (182): 68-71

CALLISTO, M., MORETTI, M., GOULART, M. D. C. 2001b. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 6 (1)71-82.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007. Disponível em <www.cbra.org.br>. Acessado em 25 jun. 2013.

CAROLSFELD, J.; Harvey, B.; Godinho, H. P.; Zanibini-Filho, E. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal Fish Biology*, v.63, p.472-481, 2003.

CLOUD JG, Erdahl AL, GRAHAM EF. Survival and continued normal development of fish embryos after incubation at reduced temperatures. *Trans. Am. Fish. Soc*, 1988; 117: 503-506.

DESSAUER, H. C. & HAFNER, M. S. (Eds) (1984): Collections of frozen tissues: value, management, field and laboratory procedures, and directory of existing collections. Lawrence, KS: Association of Systematics Collections.

DINNYÉS, A, URBÁNVI, B, BARANVAI, B, MAQVARY, I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology*. 1998; 50(1): 1-13.

DRESSER, B. L. (2001): Frozen zoo. In *Encyclopedia of the world's zoos*: 486–490. Bell, C. E. (Ed.). Chicago, IL: Fitzroy Dearborn.

EMBRAPA. Pescadores ajudarão Embrapa a formar o primeiro banco de germoplasma com peixes vivos. 09 de jul. 2013. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/julho/2a-semana/pescadores-ajudarao->

[embrapa-a-formar-o-primeiro-banco-de-germoplasma-com-peixes-vivos#>](#). Acessado em 14 jul. 2013.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 23:1–23 (1986).

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity: biochemical or osmotic? *Cryo Lett.* 5:79–90 (1984).

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINASELL, H.; DOUGLAS, M.H.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27:247–268 (1990).

FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low temperature studies on goldfish spermatozoa. **The progressive fish culturist**, v. 28, p. 227-31. 1966.

GODOY, L. C. **Desenvolvimento de protocolo para criopreservação de folículos ovarianos de peixes usando vitrificação**. 2012; Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GODOY, L. C. de; STREIT J.; DANILO, P.; BOS-MIKICH, A. Cryopreservation of fish female gametes : recent advances and challenges. In: **World Aquaculture**. (2011) Natal, RN. Abstracts, Louisiana : World Aquaculture Society, 2011. p. 480.

GOULART, M.D. & CALLISTO, M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista FAPAM* (no prelo).

GROUT, B.; MORRIS, J.; MCLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends Biotechnol.* 8:293–297 (1990).

GROUT, B.; MORRIS, J. Freezing and cellular organization. In: **Effect of Low Temperatures on Biological Systems**. Arnold, London, pp. 147–173 (1987).

GUAN, M.; RAWSON, D.M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology*. 2008, 56: 204-208.

GWO, J.C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: A review. *Aquaculture Res.* 2000; 31: 259-271.

HAGA Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci.Fish.* 1982; 48: 1569-1572.

HAGEDORN, M. et al. First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. **Cryobiology**, New York, v. 65, n. 2, p. 157-158, 2012.

HAGEDORN, M.; Hsu E.W.; Pilatus, U.; Wildt, D.E.; Rall, W.F.; Blackband, S.J. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartamental biological system. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1996; 93(15): 7454-7459.

HAGEDORN M, Pan R, Cox EF, Hollingsworth L, Krupp D, Lewis TD, Coral larvae conservation: physiology and reproduction. *Cryobiology*. 1997; 52: 33-47.

HARVEY, B. **Preservation of fish gametes**. In.: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHISIOLOGY OF FISH, Wageningen, 1982. **Anais...**Wageningen, 1982. 144p.

HARVEY, B.; ASHWOOD-SMITH M.J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology*. 1982; 19: 29-40.

HARVEY B; CAROLSFED, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Centre, 1993.

HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. (2000) In: Tiersch TR, Mazik PM (eds) *Cryopreservation in aquatic species. Advances in world aquaculture*, vol 7. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp 332–337, 2000.

HOLT W.V.; BENETT, P.M.; VOLOBOUEV, V.; WATSON P.F. Genetic resource banks in wildlife conservation *Journal of Zoology* **238** 531–544, 1996.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.

HOLT, W. V.; PICKARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation - *Reviews of Reproduction*. **Institute of Zoology, Regent's Park**: London NW1 4RY, UK 143–150, 1999.

HUNTER, R.H.F. **Fisiologia e Tecnologia da Reprodução da Fêmea dos animais domésticos**. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.

ISAYEVA, A, ZHANG T, RAWSON DM, Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*. 2004; 49(2): 114-122.

KAROW A.M. Jr;. Cryoprotectants – a new class of drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 21:209–223 (1969).

KOPEIKA, E; KOPEIKA, J; ZHANG, T. Cryopreservation of fish sperm. *Methods Mol. Biol.* 2007; 368: 203-17.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T., PATZNER, R. A. Methanol as Cryoprotectant and the suitability of 1.2 mL and 5 mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, Londres, v. 28, n. 6, p. 471-479, 1997.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reproduction, Nutrition and Development*, v. 20, p.1859-1868, 1980.

LEITE, L.V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de Tambaqui**. 2011. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

LEUNG LK-P, Jamieson BGM (1991) Live preservation of fish gametes. In: Jamieson BGM (ed) Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, pp 245–269.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I.. 2002. Biodiversity of Brazil: a synthesis of the current state of knowledge. In: T.M. Lewinsohn & P.I. Prado (eds.). **Biodiversidade brasileira: síntese do estado do conhecimento atual**. pp. 139-144. Contexto Acadêmica, São Paulo.

LI, J.; LIU, Q.; ZHANG, S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. Chin J Oceanol Limnol 2006;24:370–7.

LIU K, Chou T, Lin H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. Aquat. Living Resour. 1993; 6: 145-153.

MADDOCK BC. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. Progressive Fish Cult.1974; 36: 219-222.

MAGVARY, I; URBÁNYA, B; HORVÁTH, L; Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II Optimal conditions for fertilization. J. Appl. Ichthyol. 1996; 12: 117-119.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F.. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, M.. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1 ed. Amapá: Embrapa Amapá, 2009, v. 1, p. 47-63.

MARIA, A. N.; Viveiros, A. T. M.; FREITAS, R. T .F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba *Brycon orbignyanus* semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture, v. 260, n. 29, p.298-306, 2006.

MARIA A.N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C.G.C. Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. Cuenca: Universidad de Castilla la Mancha. p.183-202, 1996.

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; FREITAS, R.T.F.; OLIVEIRA, A.V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) sperm, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture, 2006; nº 260, p. 298 –306.

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; OLIVEIRA, A.V.; MORAES, G.F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). Animal Reproduction, 2006; nº 3, p. 55– 60.

MARIAL, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras (Fish semen cryopreservation in Brazil: state of the art and future perspectives). In: **Palestra apresentada no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, Fortaleza, CE**. 2012, p.124-131.

MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M; RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. Palestra apresentada no XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Recife, PE, Brasil, 25 a 27 de maio de 2011. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte**, v.35, n.2, p.64-68, abr./jun. 2011. Disponível em <www.cbra.org.br>. Acessado em 12 jun. 2013.

MARQUES, S. Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce. 2001. 98f. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Zoologia, Belo Horizonte, 2001.

MATOS, Luis. **Desvendando o Access**. São Paulo: Digerati Books, 2004. 96p.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supra-optimal rates. *Cryobiology*, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology / Cell Physiology**, p.125-142, 1984.

MAZUR P, Schneider U, Mahowald AP. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology*. 1992; 29: 39-68.

MAZUR, P. Principles of Cryobiology. In: FULLER, B., Lane, N., Benson, E. (eds.), *Life in the Frozen State*. T&F, London, pp. 415–435 (2004).

MAZUR, P. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc.* 24:75–182 (1965).

MORRIS, G.J. Direct chilling injury. In: GROUT, B.W.; MORRIS, G.J. (eds.) **Effect of Low Temperatures on Biological Systems**. Arnold, London, 1987, p. 120–146.

NASCIMENTO; A.F.; MARIA, A.N.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.; VIVEIROS, A.T. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachipomus*). *Anim Reprod Sci.* 2010.118:324 –9.

NUNES, J.F. Coconut water as diluent for goat semen. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS. Brasília. Anais. 1987.

OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; FREITAS, R.T.F. ISAU, Z.A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga, *Brycon nattereri* [Success of cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen]. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2007;59:1509 –15.

PAINTING, K.A.; PERRY M.C.; DENNING R.A.; AYAD W.G. **Guidebook for genetic resources documentation**. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI): Rome 1995. p. 317.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. v. 32, p.209-222.

PEGG, D.E.. ARNAUD, F.G. The optimization of a mixture of two permeating cryoprotectants. *Cryobiology* 25:509–510 (1988).

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. v.368, p.39-58, 2007.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory. 1987.

PLACHINTA M, ZHANG T, RAWSON DM. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *CryoLetters*. 2004; 25(6): 415-424.

POLGE, C; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949; 164: 666.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido**: abordagem técnica e sócio-econômica. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993. p. 206.

RAMOS, A.F.; NASCIMENTO, N.V.; SILVA, A.V.R.; PAIVA, N.M.A.; EGITO, A.A.; Paiva, S.R.; CASTRO, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; MARIANTE, A.S. Qualidade do sêmen bovino estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: **Simposio Iberoamericano Sobre Conservación e Utilización de Recursos Zoogenéticos**, 10, 2009, Palmira, Colombia. Memórias... Palmira, Colômbia: Universidad Nacional de Colombia, 2009. p.499-502.

RANA, K.; MCANDREW, B. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, v.76, p.335-345, 1989.

RANA, K. J. 1997. Guidelines on the collection of structural aquaculture statistics. Supplement to the Program for the world census of agriculture 2000. FAO Statistical Development Series, 5b. Roma, FAO, p. 56.

RAWSON, D.M.; MCGREGOR, R. G.; LLOYD, R.E. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. **Int. Zoo Yb.** (2011) 45: 108–123

REID, G. MCG. & HALL, H. (2003): Reproduction in fishes in relation to conservation. In *Reproductive science and integrated conservation*: 375–393. HOLT, W., Pickard, A.R., Rodger, J. & Wildt, D. E. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre, **Edipucrs**, p. 729.

RESENDE, E. K. de; CATELLA, A. C.; MARQUES, D.K.S.; ROTTA, M. A. Banco de sêmin de peixes do pantanal. 2013. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM018.pdf>>. Acessado em 14 mai. 2013.

RIBEIRO, R.M.A. **Glossário de termos de coleta e conservação de recursos genéticos**. *Ciência da Informação*. v. 24. n. 3. 1995.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Reproductive Biotechnology in Fresh Water Fish. In: V Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal. Patos, Paraíba, 2010. Anais.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; VIEIRA, M.J.A.F.; LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E. de; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C.M; NUNES, J. F. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixe da família Characidae. *Ciência Animal*, 22(1), 2012 **Palestra apresentada no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**, Fortaleza, CE, Brasil, 27 a 29 de junho de 2012. p. 255 – 268.

SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. Manual de apoio à formação e treino em Conservação ex situ de Recursos Fitogenéticos. **Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA)**, Lisboa, Portugal e **Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos (IPGRI-SSA)**, Nairobi, Quênia. 2001. p. 221.

SHEPARD, M.L.; GOLDSTONE, C.S.; COCKS, F.H.; The H₂O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology. *Cryobiology* 13:9–23 (1976).

SCHOOTS AFM, Stikkelbroeck JJM, Bekhuis JF, Denuce JM. Hatching in teleost fishes: fine structure changes in the egg envelope during enzymatic breakdown in vivo and in vitro. *J. Ultrastruct. Res.* 1982; 80: 185-196.

SCOTT, A.P.; BAYNES, S.M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 1980; 17: 707-739.

SCUDELLER, V.V.; MARTINS, F.R. Fitogeo – um banco de dados aplicado à fitogeografia. *Acta Amazônica*. v. 33, n. 1, p. 9-21. 2003.

SIPKO, T.P.; Rautian G.S; Udina I.G.; Strelchenko N.S. Conservation of genetic material from endangered and economically important ungulate species in establishment of cryobanks *Physiology and General Biology Reviews*. nº13, 1997, p. 35–98.

SOUZA, M. F. da S.; HILTON A. Jr. Análise da técnica de criopreservação do sêmen do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) para a formação de um banco de germoplasma. **REDVET: Revista eletrônica de veterinária**. V. 11, nº 11, Nov 2010, PP; 1 - 19.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. (Bulletin, 9).

STOSS J, DONLDSON, E.M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus Kisutch*). *Aquaculture*. 1983; 31: 51-65.

STOSS, J.; DONALDSON, E.M. Preservation of fish gametes. In:INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHISIOLOGY OF FISH, 1982, Wageningen. **Anais**. Wageningen: 1982. p.114-22.

STREIT JR, D. P; OLIVEIRA, A. C. de; Ribeiro, R. P; Sirol R. N.; Moraes, G. V. de; Galo, J. M; Digmayer, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós-criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 35(2): 159 - 167, 2009.

SUQUET M.; Dreanno C.; Fauvel C.; Cosson J.; Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, v.31, p.231-243, 2000.

SUZUKI, T.; Komada, H.; Takai, R.; Arii, R.; Kozima, T.T, (Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and concentration in several fish embryos. *Fish Sci.*1995; 61: 193-197.

TAITSON, P.F., CHAMI, E., GODINHO, H.P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. *Animal Reproduction Science* v.105,p.283–291, 2007.

TIERSCH, T.R.; YANG, H.; JENKINS, J.A, Dong Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007; 65: 493-508.

TSVETKOVA, L.I; COSSON, J; LINHART, O; BILLARD, R; Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. *J. Appl. Ichthyol.* 1996; 12: 107-112.

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. São Paulo, CCS/USP, 1998. *Cadernos de Ictiogenética*, 56p.

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. *Cadernos de Ictiogenética 5: Projeto de bancos genéticos na piscicultura brasileira.* São Paulo, CCS/USP, 1999. 53p.

TSAI S, RAWSON DM, ZHANG T. Studies on cryoprotectant toxicity to early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle. *CryoLetters*; 29(6): 477- 483, 2008.

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.55 n3: pp. 425-433, May/June 2012.

TSAI, S.; RAWSON, D.M.; ZHANG T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology*. 2009; 71: 1226-1233.

TSAI S.; SPINKINGS, E.; LIN C. Effects of the controlled slow cooling procedure on freezing parameters and ultrastructural morphology of Taiwan shoveljaw carp (*Varicorhinus barbatulus*) sperm. *Aquat. Living Resour.* 2010; 23: 119-124.

TSAI S.; SPINKINGS, E.; LIN C. Study on the mitochondrial activity and membrane potential after exposing later stage oocytes of two gorgonian corals (*Junceella juncea* and *Junceella fragilis*) to cryoprotectants. *CryoLetters*, 2011; 32(1): 1-12.

TONER, M.; CARVALHO, E.G.; KAREL, M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. *J. Biomech. Eng.* 115:169–174 (1993).

TOSHIMORI, K.; TSUNAMI, F. The morphology and the function of the oocyte chorion in the teleost, *Plecoglossus altivelis*. *J. Electron Microscopy.* 1976; 25: 210.

VALENTI, W. C. 2002. Aquicultura sustentável. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais. p. 111-11.

VAN DER STRATEN, K.M.; Leung, L.K.; Rossini, R; Johnston S.D. Cryopreservation of spermatozoa of black marlin, *Makaira indica* (Teleostei: Istiophoridae). *CryoLetters*; 27(4): 203-209, 2006.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. v. 57, p. 149-179, 2002.

VIVEIROS, A. T. M; AMARAL, T. B; ORFÃO, L. H; ISAU, Z. A; DANILO C. & MARCELO C. L. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features *Aquaculture Research*, 2011, 42, 858-865. VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., Goiânia, GO. 2005.

VIVEIROS, A.T.M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*) cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology*, v. 54, p. 1395-1408, 2000.

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H.; ISAÚ, Z.A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74:551-556, 2010.

VIVEIROS, A.T.M. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Catfishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. T. R. Tiersch and C. C. Green, editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 387-397, 2011.

VIVEIROS A.T.M. & GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, p. 137-150, 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; OLIVEIRA, A. V. MARIA; A. N. ORFÃO L. H.; SOUZA J. C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes meios de congelamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p.883-889, 2009.

VIVEIROS, A.T.; ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N.; ALLANN, I.B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim Reprod Sci*, 2009, n° 112, p.293–300.

VIVEIROS, A.T.M.; ISAU, Z.A.; CANEPPELEB, D; LEAL, M.C.; Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology*, n°78, 2012, p.803–810.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review _ Springer Science+Business Media B.V. 2008, *Fish Physiol Biochem* (2009) 35:137–150.

WATSON, P.F., FULLER, B.J. Principles of Cryopreservation of Gametes and Embryos. In: WATSON, P.F., HOLT, W.V. (eds.), *Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future?* T&F, London, pp. 156–170 (2001).

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.

WIIDT, D. E. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. Elsevier Science Publishers B.V.: **Amsterdam, Animal Rproduction Science**, n° 28, p. 247-257, 1992.

WILDT, D.E. Genome resource banking. Impact on biotic conservation and society. In **Reproductive Tissue Banking**. pp 399–439 Eds AM Karow and J Critser. Academic Press: New York, 1997.

ZAMPOLLA T, RAWSON DM, ZHANG T. Development of new viability assessment methods for zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*. 2006; 58:16.

ZHANG T, RAWSON DM. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*. 1995; 32: 239-246.

ZHANG T, RAWSON DM. Feasibility studies on vitrification of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*. 1996; 33: 1-13.

ZHANG, T.T; RAWSON D.M. Permeability of dechorionated 1-cell and 6-somite stage zebrafish (*Brachydaniorerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology*. 1998; 37: 13-21.

ZHANG T, LIU XH, RAWSON DM. Effects of metanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*. 2003; 59(7): 1545-1556.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; PEKARSKY, I.; BLAIS, I.; LUBZENS, E. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. P.J. Babin et al (eds.), **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**, Springer: 2007, p.411–436.

ZHANG T, RAWSON DM, MORRIS, GJ. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquat. Living Resour.* 1993; 6: 145-153.

ZHANG T, ISAYEVA A, Adams SL, RAWSON DM. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*. 2005; 50: 285-293.