

DILUENTES E PROPORÇÕES SÊMEN:DILUENTE NA CRIOCONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE ROBALO-PEVA *Centropomus parallelus*

Rodrigo Massao TIBA ¹; Idili da Rocha OLIVEIRA ²; Pedro Carlos da Silva SERRALHEIRO ²; Sergio OSTINI ³

RESUMO

Com a finalidade de desenvolver um protocolo de criopreservação do sêmen do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, foram realizados, no Instituto de Pesca/SAA-SP, estudos para otimizar a motilidade e tempo de motilidade espermáticas e a capacidade de fecundação do sêmen. Foram utilizados 50 reprodutores, oriundos de reprodução artificial, criados em tanque-rede instalado em ambiente oceânico. O sêmen, diluído em três soluções de Ringer (pH 6,1, 7,8 e 8,2), nas proporções sêmen:diluyente de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5, foi congelado em vapor de nitrogênio e, posteriormente, transferido para nitrogênio líquido. A velocidade de congelamento, a concentração do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) e o tempo de equilíbrio foram, respectivamente, 90 °Cmin⁻¹, 10% e 60 segundos. A capacidade de fecundação foi determinada calculando-se volumes de sêmen, para obtenção das concentrações 4x10⁴, 1x10⁵, 1,6x10⁵ e 2,2x10⁵ espermatozoides:ovócito. Para desova, as fêmeas receberam gonadotrofina coriônica humana (hCG), na dose 1 UI/g/peso. Para o sêmen fresco, a motilidade foi de 100 %, o tempo de motilidade de 464,6±47,56s. Para o sêmen criopreservado, os melhores resultados foram motilidade de 70,0± 3,94% e tempo de motilidade de 610,8± 9,60s, com o diluyente de pH 8,2. Não foram observadas diferenças significativas (p<0,01) em relação às diferentes proporções sêmen:diluyente. Foram obtidas taxas de fecundação (99,0± 0,66%) iguais (p<0,01) a partir da concentração 1,6x10⁵ espermatozoides:ovócito, indicando que a criopreservação constituiu-se um recurso importante para estoque de sêmen e controle da reprodução do robalo-peva.

Palavras-chave: robalo-peva; *Centropomus parallelus*; sêmen; criopreservação; diluyente; tanque-rede

EXTENDERS AND SEMEN:EXTENDER RATIO IN THE CRYOPRESERVATION OF SPERM OF FAT SNOOK *Centropomus parallelus*

ABSTRACT

Aiming to develop semen cryopreservation methods of the fat snook, *Centropomus parallelus*, studies were carried out in the Instituto de Pesca-SP, to optimize the sperm motility and motility time and semen fertilization capacity. Fifty reproducers, originated from artificial reproduction, were brought up in cages that were set in oceanic environment. The semen, diluted in three Ringer's solutions (pH 6.1, 7.8 and 8.2) in the proportions of 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 and 1:5, was frozen by nitrogen vapor and later on, transferred to liquid nitrogen. The cooling rate, the dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotector concentration and the equilibration time were 90 °C.min⁻¹, 10% and 60 seconds, respectively. The fertilization capacity was determined by calculating volumes of semen necessary to obtain the sperm:egg proportion of 4.10⁴, 1.10⁵, 1.6.10⁵ and 2.2.10⁵. Regarding the spawning eggs, the females received human chorionic gonadotropin (hCG) and 1 IU/g/body weight. Regarding fresh semen, the motility was 100%, as the motility time was 464.6± 47.56 secs. For cryopreserved semen, the best results for a 70.0± 3.94% motility and 610.8± 9.60 secs motility time, using the diluent with an 8.2 pH. No significant differences (p<0.01) were observed regarding the different semen:diluent proportions. Finally, equal (p<0.01) fertilization rates (99.0± 0.66%) were obtained from 1.6.10⁵ sperm:egg concentration, indicating that cryopreservation sets itself as an important resource for semen stocking and the fat snook reproduction control.

Key words: fat snook; *Centropomus parallelus*; semen; cryopreservation; extender; floating net cage

Artigo Científico: Recebido em: 10/09/2007 - Aprovado em: 08/05/2009

¹ Aluno do Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca (SAA - SP). Av. Francisco Matarazzo, 455 - CEP: 05001-900 - São Paulo - SP - Brasil. e-mail: rodrigotiba@yahoo.com.br

² Pesquisador Científico - Instituto de Pesca (SAA - SP). Av. Prof. W. Besnard, sn - CEP: 11990-000 - Cananéia - SP - Brasil. e-mail: idili@pesca.sp.gov.br, carlos@pesca.sp.gov.br

³ Pesquisador Científico - Instituto de Pesca (SAA - SP). Rua Joaquim Lauro Monte Claro Neto, 2275 - CEP: 11680-000 - Ubatuba - SP - Brasil. e-mail: sostini@pesca.sp.gov.br

INTRODUÇÃO

Desde o êxito alcançado por BLAXTER (1953) na hibridização de duas populações de arenques, com períodos de desova sazonalmente separados, reconhece-se que os métodos de preservação “*ex situ*” de espermatozóides, têm tido importante papel na reprodução assistida de mais de 200 espécies, com importantes impactos para a piscicultura moderna (TIERSCH, 2000), principalmente, de espécies marinhas (GWO, 2000; SUQUET *et al.*, 2000).

Segundo LUBZENS *et al.* (1997), dentre os benefícios resultantes da preservação de sêmen incluem o prolongamento da estação reprodutiva, a fecundação cruzada entre espécies próximas que apresentam períodos reprodutivos não coincidentes, o melhoramento genético por meio de técnicas clássicas e manipulação genética e, ainda, a autofecundação de espécies hermafroditas protândricas.

Sobre o robalo-peva *Centropomus parallelus*, o relativo sucesso das pesquisas em reprodução artificial, por meio de tratamento hormonal, e a produção de jovens em escala-piloto já consolidadas (MIOSO, 1995; GODINHO *et al.*, 2000; ALVAREZ-LAJONCHÉRE e MOLEJÓN, 2001; FERRAZ *et al.*, 2003), tem atraído o interesse de piscicultores para a exploração da espécie em escala comercial.

Em relação à crioconservação de sêmen de *C. parallelus*, as informações existentes (SERRALHEIRO *et al.*, 1998) ainda são insuficientes para avaliar o seu potencial no controle da reprodução.

O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos de diferentes tipos de diluente e proporções sêmen:diluente, na motilidade e tempo de motilidade espermáticas e, também, na capacidade de fecundação do sêmen do robalo-peva, submetido à temperaturas criogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manejo dos Reprodutores

O lote de reprodutores de *C. parallelus* utilizado nos experimentos foi originado de reprodução induzida e larvicultura conduzidas em fevereiro de 2002, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul, Instituto de

Pesca, Cananéia (SP). Com idade de 3 meses, os jovens foram transferidos para o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte, Instituto de Pesca, Ubatuba (SP), e confinados em tanques conectados em sistema de recirculação de água marinha, durante 180 dias, e depois em tanque-rede (2x2x1,5m) instalado em ambiente marinho.

Durante o período de crescimento e maturação, foi fornecido como alimento ração comercial com 40% de proteína bruta, na proporção de 3% do peso, administrada duas vezes ao dia, às 9:00 e 17:00 horas. Em fevereiro de 2004, 50 machos, caracterizados como sexualmente maduros pelo sêmen extruído após leve compressão do abdome, e 20 fêmeas, identificadas pelos ovócitos retirados por meio de biópsias ovarianas, foram separados aleatoriamente do estoque de origem e transferidos para tanques internos (10 m³) conectados em sistema de recirculação de água marinha. A salinidade de 35 ppt, temperatura de 26 °C e oxigênio dissolvido de 5 mgL⁻¹, foram mantidos constantes durante período de aclimação de 5 dias, antes do início dos experimentos.

2. Coleta do Sêmen

Para evitar qualquer contaminação por urina, água e muco (RANA *et al.*, 1992), e evitar também incidência de luz, o sêmen de cada exemplar, liberado através do poro genital por compressão abdominal, foi aspirado, individualmente, com seringas estéreis de 1 mL, graduadas (0,01 ml), envoltas em papel opaco. Em seguida, o conteúdo de cada seringa foi transferido, separadamente, para frascos opacos de polipropileno (5 ml) mantidos em 26 °C.

Para a análise das características do sêmen fresco, foram utilizadas amostras extruídas de 10 peixes, escolhidos aleatoriamente do lote inicial de 50 machos. Semelhante número, também, foi empregado para cada teste de congelamento e de fertilização.

3. Características do Sêmen Fresco.

Em seguida à mensuração do comprimento total (mm) e peso total (g), o sêmen, de cada um dos 10 machos de *C. parallelus* selecionados foi extruído individualmente para a determinação do volume do sêmen colhido (ml) e da motilidade

(%), tempo de motilidade (s) e concentração de células (cél/ml) espermáticas.

O volume do sêmen foi mensurado diretamente na seringa, após empacotamento da massa espermática.

A motilidade e o tempo de motilidade foram estimados usando microscópio de contraste de fase (200x), após a ativação dos espermatozoides, iniciada com a mistura de amostras de 15 μ L do sêmen, depositado previamente em lâminas de microscopia, com 15 μ L de água marinha natural esterilizada (salinidade de 35 ppt). A homogeneização foi feita com auxílio de lâmina que, em seguida, foi colocada sobre a preparação. Essas características foram aferidas simultaneamente na mesma preparação, usando um único campo focal escolhido aleatoriamente, com intensidade de luz mantida inalterada. A motilidade foi estimada subjetivamente, registrando-se a porcentagem das células em movimento de deslocamento visualizadas no campo microscópico. O tempo da motilidade foi cronometrado do início da ativação até o momento em que todas as células se tornaram imóveis.

A densidade espermática foi determinada através da contagem, em câmara de Neubauer, das células espermáticas presentes, previamente diluídas em solução salina de formol a 5%.

As médias do volume e da densidade espermática foram utilizadas como referências para os experimentos de congelamento.

4. Crioconservação do Sêmen

Nos experimentos de crioconservação foram utilizadas amostras de sêmen de 10 indivíduos, misturadas entre si, que apresentaram sêmen com motilidade espermática superior a 90%. A velocidade de congelamento usada foi de 90 $^{\circ}$ Cmin⁻¹; a concentração do crioprotetor (DMSO) de 10% e o tempo de equilíbrio de 60 segundos.

Cinco palhetas criogênicas de 0,25 ml (repetições) foram usadas para envasar sêmen em cada um dos experimentos de congelamento. Como aparelho congelador foi usado um botijão criogênico com vapor de nitrogênio (Taylor-Wharton, CP 100), à temperatura de -196 $^{\circ}$ C. A temperatura no interior do botijão e a referente à

velocidade de congelamento foi monitorada com sensores termopar (Ética Equipamentos Científicos, 521.200). Após permanência de 12 h, neste aparelho, as palhetas foram transferidas para outro botijão contendo nitrogênio líquido.

Vinte e quatro horas após o congelamento, as palhetas foram descongeladas em água a 26 $^{\circ}$ C, durante 2 minutos, para aferição das características de motilidade (%) e tempo de motilidade (s) espermáticas.

4.1. Experimento I - Determinação do Diluyente

Para determinação do mais efetivo diluyente para o congelamento do sêmen de *C. parallelus*, foram avaliadas as seguintes soluções iônicas, com diferentes complexidades e pH, baseadas na composição química do plasma seminal de teleosteos marinhos:

- NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl₂, 0,2; MgCl₂, 0,4266 g/L, pH 6,1 (CHAO *et al.*, 1975);
- NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl₂, 0,3; NaHCO₃, 0,2 g/L, pH 7,8 (PELETERO *et al.*, 1996);
- NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl₂, 0,22; MgCl₂, 0,72531; NaH₂PO₄, 0,0805; NaHCO₃, 0,84 g/L, pH 8,2 (SERRALHEIRO *et al.*, 1999).

A proporção final sêmen:diluyente usada foi de 1:1 (v/v). O volume total de sêmen colhido de 10 indivíduos (12,5 ml) foi inicialmente misturado em um único frasco de polietileno opaco (15 ml). A seguir, alíquotas de 2 ml foram distribuídas em três frascos menores (5 ml). Nestas, foram adicionadas, lentamente, 2 ml das respectivas soluções diluentes previamente acrescidas de 10% do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO). O material relativo a cada uma das diluições foi aspirado para o interior de cinco palhetas (0,25 ml), criteriosamente identificadas e depositadas no interior do botijão criogênico. A velocidade de congelamento foi registrada em duas das palhetas com material relativo a cada solução diluidora. Sensores termopar afixados no topo de uma das extremidades das palhetas, em contato direto com o sêmen, monitoraram a velocidade de congelamento, entre +26 e -196 $^{\circ}$ C. A solução diluyente que demonstrou melhor desempenho em relação à preservação da motilidade e do tempo de motilidade foi usada no experimento subsequente.

4.2. Experimento II - Determinação da Proporção Sêmen:diluyente

As proporções finais de sêmen:diluyente de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 (v/v) foram testadas com o sêmen do robalo-peva. O sêmen, colhido individualmente de 10 machos, foi misturado em frasco de polietileno opaco (15 ml). Cinco alíquotas de 2 mL foram separadas, do volume total do sêmen colhido (11,9 ml), e depositadas em frascos individuais onde se acrescentou o diluyente pH 8,2 contendo 10% de DMSO, que no teste anterior, resultou em maior motilidade e tempo de motilidade espermáticas. Os volumes de 2; 4; 6; 8 e 10 ml do referido diluyente foram então acrescentados, respectivamente, a cada alíquota do sêmen correspondente à proporção desejada.

4.3. Experimento III - Determinação da Capacidade de Fecundação do Sêmen Crioconservado

Os testes de capacidade de fecundação usando-se sêmen fresco e crioconservado foram realizados, simultaneamente, inseminando-se ovócitos oriundos de uma fêmea. Para o sêmen fresco foram utilizados, também, o mesmo diluyente e a mesma diluição do sêmen crioconservado.

No total foram injetadas 10 fêmeas, pesando entre 550 e 700 g, e a melhor desova foi utilizada para os testes. As fêmeas foram selecionadas levando-se em consideração o valor médio do diâmetro dos ovócitos, o padrão de distribuição porcentual dos valores do diâmetro e a localização da vesícula germinativa nas células, segundo GODINHO *et al.* (2000). Os ovócitos foram retirados por cânula plástica introduzida no interior das gônadas pelo poro genital. Todas apresentaram ovócitos com diâmetro médio ao redor de 410 μm , distribuição de frequência porcentual de valores dos diâmetros unimodal, com moda em 432,6 μm e vesícula na posição central. Dose única de 1 I.U. de hCG (gonadotropina coriônica humana) por grama de peso corporal foi aplicada por via intramuscular. A liberação dos ovócitos teve início aproximadamente 33 horas após injeção do hormônio, momento em que foi feita a extrusão para os testes de fertilização a seco. A temperatura e a salinidade da água foram mantidas, respectivamente, em 26°C e 35.

Em seguida, 40 lotes de ovócitos, contendo aproximadamente 1.000 ovócitos/lote, foram distribuídos em recipientes plásticos de 50 ml para a inseminação simultânea, sendo 20 lotes de ovócitos para o sêmen fresco e 20 lotes para o crioconservado.

Na inseminação, com ambos os semens, foram utilizados volumes diferentes calculados com auxílio de microsseringas, de acordo com a média da concentração espermática do sêmen fresco, para corresponder às concentrações de espermatozóides: ovócito de $4 \times 10^4:1$; $1 \times 10^5:1$; $1,6 \times 10^5:1$ e $2,2 \times 10^5:1$.

Para cada uma das concentrações de sêmen propostas (tratamentos) foram inseminados 5 lotes de ovócitos (repetições). Após a mistura do sêmen com os ovócitos, foi adicionada água marinha (35) para ativar os espermatozóides e iniciar a fecundação.

O material correspondente a cada parcela foi, posteriormente, depositado em incubadoras individuais com volume de 1 L, mantidas dentro de um tanque com circulação intermitente de água marinha (35) e temperatura de 26°C.

Dezessete horas após a inseminação, antes do início da eclosão das larvas, os ovos de cada incubadora foram fixados em solução salina de formol a 5% e estocados em frascos plásticos, para posterior aferição do percentual dos embriões formados.

5. Análise dos Dados

Para análise estatística foi utilizado o SAS (Statistical Analyses System, o SAS/STAT, versão 6.11 de 1990). A análise de variância foi efetuada pelo procedimento ANOVA. Posteriormente, para verificação de diferenças significativas, foi aplicado o teste de variação múltipla de Tukey.

RESULTADOS

1. Características do Sêmen Fresco

Os resultados da análise das características do sêmen fresco estão representados na Tabela 1, assim como, de peso e comprimento totais dos exemplares.

O valor médio obtido de $2,5 \times 10^{10}$ céls ml^{-1} foi utilizado como referência na determinação das proporções espermatozóides:ovócito do experimento III.

Tabela 1. Dados de comprimento total (mm), peso total (g), volume de sêmen (mL), concentração de espermatozoides (cél mL⁻¹), motilidade (%) e tempo de motilidade espermáticas (s) de *C. parallelus*

Macho n°	Comprimento Total (mm)	Peso Total (g)	Características do sêmen fresco			
			Volume Sêmen (ml)	Concentração Espermática (x10 ¹⁰ céls ml ⁻¹)	Motilidade Espermática (%)	Tempo de Motilidade (s)
1	268,0	600,0	1,9	2,50	100	480,0
2	259,0	590,0	2,0	2,74	100	455,0
3	285,0	700,0	1,8	2,50	100	398,0
4	362,0	750,0	2,4	2,05	100	523,0
5	355,0	750,0	2,1	2,76	100	511,0
6	339,0	740,0	0,8	2,95	100	478,0
7	270,0	610,0	2,3	2,01	100	378,0
8	325,0	740,0	2,1	2,36	100	461,0
9	345,0	745,0	2,3	2,48	100	511,0
10	362,0	765,0	0,9	2,67	100	451,0
Média ± desvio	317,0±41,93	699,0± 70,42	1,9±0,56	2,5±0,30	100±0,00	464,6±47,56

2. Crioconservação do Sêmen

2.1. Experimento I - Determinação do Diluyente

Os resultados deste experimento indicaram que o diluyente 3, com pH ajustado para 8,2, apresentou o melhor tempo de motilidade de 610,8 ± 9,60s, quando comparado aos diluyentes 1 e 2, com diferenças significativas (p<0,01). Em relação à motilidade, os resultados obtidos com os três

diluyentes não apresentaram diferenças significativas (p<0,01) (Tabela 2).

2.2. Experimento II - Determinação da Proporção Sêmen:diluyente

Em relação aos resultados, deste experimento, não foram observadas diferenças significativas (p<0,01) entre os valores de motilidade e tempo de motilidade espermáticas, nas diferentes proporções sêmen:diluyente utilizadas (Tabela 3).

Tabela 2. Motilidade (%) e tempo da motilidade (segundos) (Médias ± DP; n=10 machos; 5 palhetas/tratamento) do sêmen crioconservado de *C. parallelus*, diluído 1:1 (v/v) em diferentes diluyentes com 10% de DMSO

Diluyente	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
Diluyente 1 (pH 6,1)	69,7 ± 6,42 ^a	354,7 ± 8,34 ^c
Diluyente 2 (pH 7,8)	70,0 ± 3,94 ^a	421,6 ± 13,09 ^B
Diluyente 3 (pH 8,2)	70,0 ± 3,94 ^a	610,8 ± 9,60 ^A

Diluyente 1: NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl₂, 0,2; MgCl₂, 0,4266 g/L (CHAO et al., 1975)

Diluyente 2: NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl₂, 0,3; NaHCO₃, 0,2 g/L (PELETERO et al., 1996)

Diluyente 3: NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl₂, 0,22; MgCl₂, 0,72531; NaH₂PO₄, 0,0805; NaHCO₃, 0,84 g/L (SERRALHEIRO et al., 1999)

^a Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,01)

^{A - C} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,01)

Tabela 3. Comparação da motilidade (%) e tempo de motilidade (segundos) (Médias \pm DP; n=10 machos; 5 palhetas/tratamento) do sêmen crioconservado de *C. parallelus* diluído em diferentes concentrações finais da solução pH 8,2 com 10% de DMSO

Sêmen: diluyente*	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
1:1	74,0 \pm 4,18 ^a	738,0 \pm 8,60 ^A
1:2	74,0 \pm 5,47 ^a	732,4 \pm 5,41 ^A
1:3	74,0 \pm 4,18 ^a	736,2 \pm 10,75 ^A
1:4	74,0 \pm 6,51 ^a	735,6 \pm 7,82 ^A
1:5	74,0 \pm 6,51 ^a	733,6 \pm 12,54 ^A

* Composição diluyente: NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl₂, 0,22; MgCl₂, 0,72531; NaH₂PO₄, 0,0805; NaHCO₃, 0,84 g/L, pH 8,2 (SERRALHEIRO *et al.*, 1999)

^a Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna são diferentes significativamente ($p < 0,01$)

^A Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna são diferentes significativamente ($p < 0,01$)

2.3 Experimento III – Determinação da Capacidade de Fecundação do Sêmen Crioconservado

O sêmen fresco apresentou melhores resultados do que o crioconservado, nas proporções espermatozoides:ovócito de 4x10⁴:1 e 1x10⁵:1, com diferenças significativas entre as duas proporções ($p < 0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das taxas de fertilização do sêmen fresco (Médias \pm DP) (n=10; diluído 1:1) e crioconservado (n=10 machos; 5 palhetas; diluído 1:1; diluyente pH 8,2; 10% de DMSO) de *C. parallelus* em relação a diferentes proporções espermatozoides:ovócito

Esp:ovócito	Sêmen fresco	Sêmen congelado*
4,0x10 ⁴ :1	23,2 \pm 2,77 ^{A c}	15,0 \pm 1,58 ^{B c}
1,0x10 ⁵ :1	84,2 \pm 0,84 ^{A b}	74,2 \pm 0,84 ^{B b}
1,6x10 ⁵ :1	99,0 \pm 0,71 ^{A a}	99,0 \pm 0,71 ^{A a}
2,2x10 ⁵ :1	98,0 \pm 2,12 ^{A a}	98,4 \pm 1,14 ^{A a}

* Composição diluyente: NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl₂, 0,22; MgCl₂, 0,72531; NaH₂PO₄, 0,0805; NaHCO₃, 0,84 g/L, pH 8,2 (SERRALHEIRO *et al.*, 1999)

^{a-c} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna são diferentes significativamente ($p < 0,01$)

^{A-C} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma linha são diferentes significativamente ($p < 0,01$)

Analisando-se as médias das porcentagens de fecundação, os dois tipos de sêmen atingem o máximo de fecundação com igual desempenho, sem diferença significativa ($p < 0,01$), nas proporções espermatozoides:ovócito de 1,6x10⁵:1 e 2,2x10⁵:1 (Tabela 4).

DISCUSSÃO

1. Características do Sêmen Fresco

Em peixes, o volume do sêmen e a densidade, motilidade e tempo de motilidade espermáticas têm sido comumente utilizados para a determinação da qualidade do sêmen fresco e/ou congelado (STOSS, 1983; BILLARD *et al.*, 1996).

Para os propósitos da piscicultura, o volume de sêmen colhido, que corresponde entre 20 a 50% do conteúdo total do sêmen retido nos testículos (BILLARD, 1990), é muito utilizado como indicador da produção espermática.

A colheita do sêmen diretamente do poro genital com seringas (1ml), possibilitou eliminar materiais indesejados. RANA *et al.* (1992) elucidaram que a contaminação do sêmen, principalmente por urina, freqüentemente ignorada nos procedimentos de colheita, pode significar um aumento de até 80% no volume resultante, refletindo significativamente na qualidade e quantidade do ejaculado.

A densidade espermática variando de 2,2 a 2,8x10¹⁰ céls mL⁻¹, pode ser considerada relativamente elevada, levando-se em consideração os limites das espécies compiladas por RANA (1996), com variação entre 2,0x10⁶ e 6,5x10¹⁰ céls mL⁻¹. No robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), FAUVEL *et al.* (1999) encontraram densidades variando entre 5,0 e 5,5x10¹⁰ céls mL⁻¹, equivalendo ao dobro do robalo-peva. Embora a literatura registre estudos sobre crioconservação do sêmen do robalo asiático *Lates calcarifer* (LEUNG, 1987) e do robalo-flexa *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004), espécie muito próxima ao robalo-peva e com período de reprodução semelhante, a ausência de registros sobre densidade espermática impossibilita a comparação entre seus dados.

A motilidade e sua duração vêm sendo correlacionadas com a capacidade de fecundação do sêmen desde os primórdios das técnicas de reprodução dos peixes (RANA, 1996).

O sêmen fresco de todos exemplares de robalo-peva mostrou uma alta porcentagem de células móveis (100%), indicando que o manejo oferecido aos reprodutores foi bem sucedido na promoção da maturação sexual dos reprodutores e no processo de gametogênese. A motilidade obtida foi superior às motilidades do sêmen do robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (FAUVEL *et al.*, 1999) e do robalo-flexa *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004), ambos com taxas de motilidade ao redor de 80%, e do vermelho *Lutjanus campechanus* (RILEY *et al.*, 2004), com 95%.

Os valores médios da duração da motilidade espermática obtidos para o robalo-peva (464,6 ± 47,56 segundos) ficaram próximos aos obtidos por BILLARD (1978) para o robalo europeu *Dicentrarchus labrax* e para a dourada *Spaurus aurata*.

2. Crioconservação do Sêmen

2.1 Experimento I - Determinação do Diluyente

Em temperaturas criogênicas, de acordo com GWO (2000), as características seminais somente podem ser preservadas se, antes do início do congelamento, o sêmen for diluído em soluções adequadas.

Os diluentes, cujo requisito essencial é manter os espermatozoides imobilizados, são concebidos principalmente para que, durante o congelamento e o descongelamento, as trocas osmóticas das células possam ser continuamente restabelecidas, corrigindo os sucessivos desequilíbrios nas concentrações iônicas dos solutos, que acompanham as mudanças de temperaturas (GWO, 2000).

Muitos diluentes empregados na crioconservação do sêmen de peixes marinhos se baseiam na composição do plasma sanguíneo e/ou seminal (RANA, 1996). Vários estudos têm sido realizados sobre os efeitos de íons, principalmente Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, na iniciação e na duração da motilidade dos espermatozoides, visando aumentar a qualidade do movimento celular e otimizar a reprodução de espécies de peixes marinhos (BILLARD *et al.*, 1993; LAHNSTEINER *et al.*, 1997).

As três soluções iônicas usadas no congelamento do sêmen do robalo-peva, foram baseadas na composição química do plasma seminal de outros teleosteos marinhos: a) pH 6,1, citada para a tainha *Mugil cephalus* (CHAO *et al.*,

1975); b) pH 7,8, elaborada para o linguado *Scophthalmus maximus* (PELETEIRO *et al.*, 1996); c) pH 8,2, desenvolvida inicialmente para a tainha *Mugil platanus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1999). Além do pH, esses diluentes se diferenciaram com relação à presença de algumas substâncias utilizadas na formulação e à osmolalidade (não determinada neste estudo). O diluyente pH 6,1, diferiu dos demais pela ausência das substâncias fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃), presentes no diluyente pH 8,2. No meio pH 7,8, NaH₂PO₄, também não foi adicionado e o conteúdo de NaHCO₃, correspondeu a ¼ do seu equivalente no pH 8,2. Outra diferença importante foi com relação ao cloreto de cálcio (CaCl₂), que, ausente da formulação do diluyente pH 7,8, foi adicionado aos diluentes pH 6,1 e pH 8,2, em proporções diferentes. Já, o cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de cálcio (CaCl₂) foram utilizados comumente nos três diluentes, exceto pela concentração diferente no diluyente pH 7,8.

Em razão dessas características, efeitos importantes puderam ser constatados no congelamento do sêmen do robalo-peva com relação à motilidade e, principalmente, ao tempo de motilidade. Enquanto as taxas de motilidade foram semelhantes para os três diluentes testados (70%), independentemente da heterogênea composição química e dos diferentes pH, o tempo de motilidade flutuou significativamente. Quando o sêmen foi crioconservado nas soluções pH 6,1 e pH 7,8, combinadas com DMSO, os tempos de motilidade, respectivamente, de 354,7 ± 8,34s e de 421,6 ± 13,09s, foram inferiores ao do sêmen fresco (464,6 ± 47,56s). Porém, quando o sêmen foi congelado na solução pH 8,2, a mais complexa das soluções testadas, no tempo de motilidade foi registrado 610,8 ± 9,60s, bem superior aos semens fresco e crioconservados com os demais diluentes, com importantes reflexos para a fertilização. Resultado similar, também, foi obtido com sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (SANCHES *et al.*, 2008), crioconservado com a mesma solução. Essa surpreendente otimização do movimento, que pode refletir em apreciável aumento do período de viabilidade espermática, relaciona algumas características específicas desse diluyente (pH alcalino, maior concentração de NaHCO₃ e osmolalidade mais elevada) na

sustentação de um novo micro-ambiente aos espermatozoides, distinto do ambiente fisiológico proporcionado pelo plasma seminal. Aparentemente, esses constituintes foram capazes de interagir com os constituintes químicos das estruturas internas do flagelo responsáveis pela excitação do espermatozoide (INABA, 2003), reorganizando o padrão do tempo de motilidade que foi preservado após o processo de congelamento. Os efeitos do pH, NaHCO_3 e osmolalidade sobre os mecanismos de regulação da motilidade têm sido enfatizados em muitos estudos com espécies marinhas e de água doce (ODA and MORISAWA, 1993a; COSSON, 2004; COSSON *et al.* 2008). Alta sensibilidade do tempo de motilidade dos espermatozoides às flutuações da osmolalidade, do pH e do NaHCO_3 , oferecidos através de meios artificiais, tem sido usualmente confirmada em sêmen fresco da truta *Oncorhynchus mykiss* (BILLARD and COSSON, 1988), esturjão *Acipenser persicus* (ALAVI *et al.*, 2004), carpa *Cyprinus carpio* (MARIAN *et al.*, 1997).

Em diluentes usados no congelamento do sêmen tanto de espécies cultivadas em ambientes tropicais como de água fria, marinhas e de água doce, tem sido recomendado o uso, principalmente, dos cloretos de sódio, de potássio, de cálcio, de magnésio e do bicarbonato de sódio, sais que foram avaliados no presente estudo, para atuarem como fontes dos íons mais comuns do plasma seminal, como Cl, Na, K, Ca, e Mg_2 (CIERESKO *et al.*, 2000). Exames negativos para a motilidade, obtidos em amostras individuais do sêmen do robalo diluídas em cada um dos três diluentes contendo DMSO, previamente ao congelamento, asseguraram que as concentrações iônicas finais não interferiram na osmolalidade do sêmen ao ponto de induzir a motilidade dos espermatozoides, conforme tem sido observado em várias espécies (MEDINA *et al.*, 2005).

O bicarbonato de sódio, além de ser fonte adicional de sódio, vem sendo associado aos mecanismos regulatórios da motilidade (COSSON *et al.*, 2008a; COSSON *et al.*, 2008b; GARZÓN *et al.*, 2008). Convertido em dióxido de carbono CO_2 e íons hidrogênio (H^+) e carbonato (HCO_3^-) pela anidrase carbônica, o bicarbonato de sódio influencia o pH intracelular dos espermatozoides, um importante fator interno para iniciação da motilidade espermática (LEE *et al.*, 1983; ODA and

MORISAWA, 1993b). No sêmen da enguia *Anguilla anguilla* crioconservado em meios enriquecidos com essa substância (TANAKA *et al.*, 2002; GARZÓN *et al.*, 2008) foi observado incremento no número de espermatozoides móveis, em discordância com o presente estudo. Esses autores, no entanto, não avaliaram o tempo de motilidade.

Na composição dos diluentes para peixe marinho, atenção especial tem sido dada ao pH e à capacidade de tamponamento. Alguns estudos têm demonstrado que diluentes com pH ajustado entre 7,8 e 8,5 (alcalinos) e adequadamente tamponados com substâncias inorgânicas, como os fosfatos e/ou bicarbonatos de sódio e/ou potássio, como os empregados para o robalo-peva, têm tido um melhor desempenho na preservação da viabilidade dos espermatozoides, ao contrário dos diluentes sem capacidade de tamponamento e com pH ácidos ou próximos do neutro (PELETEIRO *et al.*, 1996). Usualmente em peixes marinhos, as soluções diluentes são tamponadas para impedir que os metabólitos dos espermatozoides, acumulados no decorrer do processo de congelamento, provoquem mudanças no pH do sêmen, deletérias aos espermatozoides (GWO, 2000). O pH do diluente ao redor de 8 tem sido indicado como eficiente na preservação de espermatozoides do linguado *Scophthalmus maximus*; pH 8,3 (SUQUET, 1992), do bacalhau do Atlântico *Gadus morhua*; pH 8,1 (MOUNIB *et al.*, 1968); da garoupa *Ephinephelus malabaricus*, pH 8 (CHAO *et al.*, 1992); e do robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, pH 8,1 (FAUVEL *et al.*, 1998).

2.2 Experimento II - Determinação da Proporção Sêmen:diluyente

A diluição do sêmen antes do congelamento tem sido recomendada em peixes de água doce e marinho para otimizar a viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento (SCOTT e BAYNES, 1980).

Proporções de sêmen:diluentes podem variar de 1:1 a 1:20 (PELETEIRO *et al.*, 1996; SUQUET *et al.*, 2000), porém, para a maioria das espécies, proporções de diluição de 1:3 a 1:6 são as mais comumente usadas (MC ANDREW *et al.*, 1993).

No caso do robalo-peva, as diluições de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 (v/v), não apresentaram diferenças significativas nas taxas de motilidade e no tempo de motilidade do sêmen

crioconservado. TIERSCH *et al.* (2004) obtiveram sucesso no congelamento do sêmen do robalo-flecha *C. undecimalis* usando proporção de diluição de 1:1. Diluições do sêmen semelhantes às empregadas no robalo-peva, também, foram testadas no congelamento com bons resultados para o robalo europeu *D. labrax*, na proporção de 1:3 (FAUVEL *et al.*, 1998; ZILLI *et al.*, 2005) e de 1:6 (SANSONE *et al.*, 2002). Para o robalo asiático (*L. calcarifer*), LEUNG (1987) utilizou a proporção 1:4.

DREANNO *et al.* (1997), testando quatro diluições: 1:1, 1:2, 1:4 e 1:9 no linguado *Scophthalmus maximus*, observaram que a diluição de 1:2 apresentou os melhores resultados de motilidade, após 10 a 60 segundos de ativação do sêmen crioconservado. RIDEOUT *et al.* (2004), em seus testes de crioconservação de sêmen do bacalhau do Atlântico *Gadus morhua*, utilizaram a proporção de 1:3 em todos os testes de congelamento, obtendo bons resultados.

2.3 Experimento III - Determinação da Capacidade de Fecundação do Sêmen Crioconservado

Estudos determinando as condições de inseminação, que segundo FAUVEL *et al.* (1999) podem apresentar grandes variações, levantaram a hipótese de que taxas reduzidas de fecundação podem ser resultantes de ovócitos viáveis que não tiveram a chance de serem inseminados, devido ao número insuficiente de espermatozóides viáveis e/ou ao curto tempo de exposição aos espermatozóides.

A inseminação artificial de diferentes lotes de ovócitos com proporções crescentes de espermatozóides:ovócito ($4 \times 10^4:1$, $1 \times 10^5:1$, $1,6 \times 10^5:1$ e $2,2 \times 10^5:1$), utilizando simultaneamente sêmen fresco e congelado, revelou, para ambos, variação da capacidade de fecundação, com duas fases distintas. Na primeira, foi observado rápido crescimento da taxa de fecundação, à medida que as concentrações de espermatozóides:ovócito aumentaram de $4 \times 10^4:1$ para $1 \times 10^5:1$, com as taxas de ovos viáveis variando, para o sêmen fresco e o congelado, respectivamente, de $23,2 \pm 2,77$ a $84,2 \pm 0,84\%$ e de $15,0 \pm 1,58$ a $74,2 \pm 0,84\%$. Na segunda fase, observada a partir da proporção $1,6 \times 10^5:1$, houve estabilização no crescimento da capacidade de fecundação, com as taxas de ovos viáveis atingindo aproximadamente 99%, para

ambos os semens. Taxas semelhantes foram obtidas, também, quando a proporção de espermatozóides:ovócito foi incrementada para $2,2 \times 10^5:1$.

As diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as taxas de fecundação obtidas para o sêmen congelado em relação ao fresco, quando se utilizou as proporções de $4 \times 10^4:1$ e $1 \times 10^5:1$, podem ser atribuídas ao menor número de espermatozóides viáveis presentes no sêmen congelado, refletido previamente na queda ao redor de 30% na motilidade do sêmen pós-descongelamento. Por outro lado, pode-se atribuir a semelhança das taxas de fecundação entre os semens, quando as proporções foram de $1,6 \times 10^5:1$ e $2,2 \times 10^5:1$, à uma compensação do número de espermatozóides viáveis contido no sêmen congelado em relação ao fresco.

Comparados com o linguado *S. maximus* ($2 \times 10^4:1$ espermatozóides:ovócito), segundo DREANNO *et al.* (1997), e com o robalo europeu *D. Labrax* ($7 \times 10^4:1$ espermatozóides:ovócito), segundo FAUVEL *et al.* (1998), o número de espermatozóides necessários para o máximo sucesso no robalo-peva pode ser considerado relativamente alto. O critério adotado no presente estudo, limitou o tempo de contacto entre os gametas, após a ativação dos espermatozóides, em apenas 60 segundos, período bem inferior ao constatado para a motilidade em ambos os semens.

CONCLUSÕES

A solução diluyente com o pH ajustado para 8,2, utilizada para o congelamento do sêmen, independente da proporção sêmen:diluyente, resultou em melhor preservação da motilidade e do tempo de motilidade espermáticas.

A concentração mínima necessária de espermatozóides para inseminar com sucesso lotes de ovócitos com sêmen crioconservado e fresco foi de $1,6 \times 10^5:1$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.; KARAMI, M.; ABDOLHAY, H.; MOZAJI AMIRI, B. 2004 Chemical composition and osmolality of

- seminal plasma of *Acipenser persicus*, their physiological relationships with sperm motility. *Aquac. Res.*, 35: 1238-1243.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. y MOLEJÓN, O.G.H. 2001 *Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 424p.
- BILLARD, R. 1978 Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de colloques du CNEXO* 8: 59-73.
- BILLARD, R. 1990 Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G.E. *Marshall's physiology of reproduction*. Churchill Livingstone: Edinburg, 2: 870-888.
- BILLARD, R. and COSSON, J. 1988 Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*: effects of pH and temperature. In Breton B. and Zohar Y. eds. *Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics*. Paris: INRA. p. 161-167.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. 1993 Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6: 67-75.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.M.; SUQUET, M. 1996 Sperm physiology and quality. In: BROMAGE N.R. and ROBERTS, R.J. *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science. p. 25-52.
- BLAXTER, J.H.S. 1953 Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 1189-1190.
- CHAO, N.H.; CHEN, H.P.; LIAO, I.C. 1975 Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5: 389-406.
- CHAO, N.H.; TSAI, H.P.; LIAO, I.C. 1992 Short and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fishery Science*, 5: 103-116.
- CIERESZKO, A.; Glogowski, J.; Dabrowski, K. 2000 Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. In: TIERSCH, T.R. and MAZIC, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p.20-48.
- COSSON, J. 2004 The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac. Int.* 12: 69-85.
- COSSON, J.; GROISON, A.-L.; SUQUET, M.; FAUVEL, C.; DREANNO, C.; BILLARD, R. 2008a Studing sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 460-486.
- COSSON, J.; GROISON, A.-L.; SUQUET, M.; FAUVEL, C.; DREANNO, C.; BILLARD, R. 2008b Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*. 136: 277-294.
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; QUEMENER, L.; COSSON, J.; FIERVILLE, F.; NORMANT, Y.; BILLARD, R. 1997 Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 48: 589-603.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; ZONNO, V.; MENU, B. 1998 Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquat. Living Resour.*, 11: 387-394.
- FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C.; COSSON, J.; SUQUET, M. 1999 Characteristics of captive seabass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, 54: 356-369.
- FERRAZ, E.M.; CERQUEIRA, V.R.; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CANDIDO, S. 2003. Indução à desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 28(2): 125-133.
- GARZÓN, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; ESPERT, X.; MÜLLER, T.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. 2008 Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cyopreservation of european eel sperm. *Reprod. Dom Anim.*, 43: 99-105.
- GODINHO, H. M.; SERRALHEIRO, P. C. S.; FERRAZ, E.M.; PIMENTEL, C. M. M.; OLIVEIRA, I.R. e PAIVA, P. 2000 Reprodução induzida em robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1860. *Braz.J.Res.anim.Sci.*, São Paulo, 37(1): 37-42.
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R. and MAZIC, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p.138-160.

- INABA, K. 2003 Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zool. Sci.*, 20: 1043-1056.
- LEE, H.C.; HOHNSON C.; EPEL, D. 1983 Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev. Biol.*, 95: 31-45.
- LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. 1997 Metanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 mL and 5 mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Reserch*, Salzburg, 28: 471-479.
- LEUNG, L. K. P. 1987 Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*, Amsterdam, 64: 243-247.
- LUBZENS, E.; DAUBE, N.; PEKARSDY, I.; MAGNUS, Y.; COHEN, A.; YUSEFOVICH, F.; FEIGIN, P. 1997 Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks: strategies in research and application. *Aquaculture*, Amsterdam, 155: 13-30.
- MĂRIĂN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; EMRI, M.; TRÓN, L. 1997 Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Cytometry*, 27: 374-382.
- MC ANDREW, B.J.; RANA, K.J.; PENMAN, D.J. 1993 Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: MUIR, J.F. and ROBERTS, R.J. *Recent Advances in: Aquaculture*, vol IV, Oxford, Blackwell. p. 295-336.
- MEDINA, V.; VELASCO, Y.; CRUZ, P. 2005 Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. *Rev. Colomb. Cienc. Pecuar.*, 18: 34-48.
- MIOSO, R. 1995 *Indução à reprodução e incubação de ovos de robalo Centropomus parallelus Poey, 1860 (Pisces, Centropomidae)*. Florianópolis. 51p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina).
- MOUNIB, M.S.; HWANG, P.C.; IDLER, D.R. 1968 Cryogenic preservation of Atlantic cod *Gadus morhua* sperm. *Journal of the Fisheries*, Canada, 25: 2623-2632.
- ODA, S. and MORISAWA, M. 1993a Rises of intracellular Ca⁺ and pH mediate the initiation of sperm motility in marine teleosts. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 25: 171-178.
- ODA, S. and MORISAWA, M. 1993b Rises of intracellular Ca⁺ and pH mediate the initiation of sperm of farmed european eel *Anguilla Anguilla*. *J. World Aquac. Soc.* 35: 240-246.
- PELETEIRO, J.B.; CHEREGUINI, O.; CAL, R.M. 1996 Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). *Informe Tecnico del Instituto Espanolological de Oceanografo*, 162: 1-13.
- RANA, K.J.; GUPTA, S.D.; MCANDREW, B.J. 1992 The relevance of collection techniques on the quality of manually stripped Atlantic salmon (*Salmo salar*) milt. In: WORKSHOP ON GAMETE AND EMBRYO STORAGE AND CRYOPRESERVATION IN AQUATIC ORGANISMS. 30 march - 2 april/1992.
- RANA, K.J. 1996 Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R. and ROBERTS, R.J. *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science, p.53-75.
- RIDEOUT, R.M.; TRIPPEL, E.A.; LITVAK, M.K. 2004 The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and effect of sperm age on cryopreservation success. *Journal of Fish Biology*, St. John's, 65: 299-311.
- RILEY, K.L.; HOLLADAY, C.G.; CHESNEY, E.J.; TIERSCH, T.R. 2004 Cryopreservation of sperm of red snapper. *Aquaculture*, 238: 183-194.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. 2008 Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Bioikos*, 22 (2): 81-90.
- SANSONE, G.; FABRIOCINI, A.; IEROPOLI, S.; LANGELLOTTI, A.L.; OCCIDENTE, M.; MATASSINO, D. 2002 Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.)

- spermatozoa after thawing. *Cryobiology, Elsevier Science, Napoli*, 44: 229-239.
- SCOTT, A.P. and BAYNES, S.M. 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17: 707-739.
- SERRALHEIRO, P.C.S.; OLIVEIRA, I.R.; GODINHO, H.M. 1998 Fertilização de ovócitos de robalo *Centropomus parallelus*, com sêmen crioconservado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12, Recife, 1998. *Anais...* Recife, p.360-1.
- SERRALHEIRO, P.C. DA S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M.; OLIVEIRA, I DA R. 1999. O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha - *Mugil platanus*, Günther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio líquido. In: *ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA*, 13, São Carlos. *Anais...* p.508.
- STOSS, J. 1983 Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. (Eds.). *Fish physiology*. New York: Academic Press. p.305-350.
- SUQUET, M. 1992 La production de sperme chez le turbot, aspects descriptifs et experimentaux. *Mémoire EPHE, Paris*.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31: 231-243.
- TANAKA, S.; ZANG, H.; RORIE, N.; YAMADA, Y.; OKAMURA, A.; UTOH, T., MIKAWA, N.; OKA, H.P.; KUROKURA, H. 2002 Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J. Fish Biol.* 60: 139-146.
- TIERSCH, T.R. 2000 Introduction. In: TIERCH, T.R. and MAZUR P.M. *Cryopreseroation in Aquatic Species*. *World Aquaculture Society*. Baton Rouge, Louisiana. p.xix-xxvi.
- TIERSCH, T.R.; WAYMAN, W.R.; SKAPURA, D.P.; NEIDIG, C.L.; GRIER, H.J. 2004 Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research*. Baton Rouge, Louisiana, 35: 278-288.
- ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; ROSSANO, R.; STORELLI, C.; VILELLA, S. 2005 Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biology of Reproduction, Lecce*, 72: 1262-1267.