

## REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DO ARIOCÓ *Lutjanus synagris*

Eduardo Gomes SANCHES<sup>1</sup> e Vinicius Ronzani CERQUEIRA<sup>2</sup>

### RESUMO

Este trabalho teve a finalidade de desenvolver um protocolo de refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. Primeiramente, a taxa de motilidade, a duração da motilidade, a concentração espermática e o espermatócrito foram avaliados para caracterizar a qualidade do sêmen fresco. Para os testes de refrigeração a 4°C, três diferentes diluentes com diferentes composições iônicas e distintos valores de pH foram testados em atmosfera normal e atmosfera modificada (100% oxigênio). Posteriormente, um teste de fertilização foi realizado para avaliar a viabilidade do sêmen refrigerado. Os resultados demonstraram que o sêmen fresco tem uma concentração espermática de  $2,2 \pm 0,2 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>, motilidade superior a 90% e permanece móvel por  $137 \pm 20$  segundos. Uma relação positiva foi encontrada entre espermatócrito e concentração espermática ( $r^2 = 0,75$ ;  $P < 0,05$ ). No experimento de refrigeração, a taxa de motilidade e a duração da motilidade foram mantidas adequadas durante 72 horas para os diluentes A ( $63 \pm 6\%$ ;  $274 \pm 44$  segundos) e B ( $63 \pm 6\%$ ;  $172 \pm 7$  segundos) em atmosfera normal. Na atmosfera modificada, a qualidade do sêmen caiu drasticamente durante as primeiras 24 horas, independente do diluente utilizado, não propiciando vantagem em sua utilização. Os resultados demonstraram que a refrigeração do sêmen do ariocó é uma alternativa viável, sendo possível manter por até 48 horas uma apropriada qualidade espermática proporcionando uma taxa de fertilização superior a 50%.

**Palavras-chave:** Refrigeração do sêmen; reprodução; maricultura

## REFRIGERATED STORAGE OF LANE SNAPPER *Lutjanus synagris* SPERM

### ABSTRACT

The aim of this study was to develop a protocol to refrigerated storage of the lane snapper sperm. Firstly, motility rate, motility time, sperm density and spermatocrit were appraised to characterize the fresh sperm quality. Three different extenders with different ionic compositions and pH values were used in the refrigerated storage sperm at 4 °C in normal atmosphere and modified atmosphere (100% oxygen). Fertilization test was accomplished to evaluate the viability of the refrigerated sperm. The results demonstrated that the fresh sperm has a spermatozoa density of  $2.2 \pm 0.2 \times 10^9$  spermatozoa mL<sup>-1</sup>, motility rate >90% and motility time for  $137 \pm 20$  seconds. A positive relationship was found between spermatocrit and spermatozoa density ( $r^2 = 0.75$ ;  $P < 0.05$ ). In the experiment of refrigerated storage, the motility rate and the motility time were maintained appropriate for 72 hours for the extender A ( $63 \pm 6\%$ ;  $274 \pm 44$  seconds) and B ( $63 \pm 6\%$ ;  $172 \pm 7$  seconds) in normal atmosphere. In the modified atmosphere, the sperm quality fell drastically during the first 24 hours, independently of the used extender, not propitiating advantage. The results demonstrated that the refrigerated sperm of lane snapper is a viable alternative for the short-term storage, being possible, to maintain for up to 48 hours an appropriate sperm viability, providing fertilization rate up to 50%.

**Key words:** Refrigerated sperm; reproduction; mariculture

---

**Artigo Científico:** Recebido em 14/10/2010 – Aprovado em 20/02/2011

<sup>1</sup> Pesquisador Científico, Mestre. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte, Instituto de Pesca/APTA/SAA. Rua Joaquim Lauro Monte Claro Neto, 2275 – Itaguá – CEP: 11.680-000 – Ubatuba – SP – Brasil. e-mail: esanches@pesca.sp.gov.br

<sup>2</sup> Professor Titular. Laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Ademar Gonzaga, 1346 – Itacorubi – CEP: 88.034-001 – Florianópolis – SC – Brasil. e-mail: vrcerqueira@cca.ufsc.br

## INTRODUÇÃO

A família Lutjanidae é representada por 70 gêneros e 103 espécies de peixes marinhos, sendo que o gênero *Lutjanus* abriga 65 espécies (39 no Indopacífico, 9 no Pacífico oriental, 12 no Atlântico ocidental e 5 no Atlântico oriental), habitantes de fundos rochosos e coralíneos de regiões tropicais e subtropicais (CLARO e LINDEMAN, 2008).

Conhecida popularmente como ariocó, a espécie *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) ocorre desde a Carolina do Norte, EUA, até o Sudeste do Brasil (FIGUEIREDO e MENEZES, 2000). Possui hábitos demersais, estando associada a fundos rochosos entre a zona costeira e a profundidade de 120 m. Sua coloração é prateado-avermelhada, com uma série de estrias longitudinais amareladas. As nadadeiras pélvica e anal são amareladas, e a caudal, avermelhada. Atinge até 60 cm, chegando a 3,8 kg, com maturidade sexual entre 15 a 18 cm. Em função da qualidade da carne e do alto valor de mercado, a espécie *L. synagris* é um importante recurso pesqueiro, estando entre as dez principais espécies capturadas na pesca de linha, com grande expressividade comercial em desembarques no Brasil (KLIPPEL e PERES, 2002; REZENDE *et al.*, 2003).

A preocupação com a redução de algumas populações das famílias Serranidae e Lutjanidae no Brasil tem reforçado o conceito no desenvolvimento de opções economicamente viáveis, ambientalmente sustentáveis e socialmente responsáveis, que visem reduzir a pressão extrativista sobre os estoques de pescado. Neste sentido, a piscicultura marinha de espécies ameaçadas pode contribuir como um instrumento estratégico para a conservação, além de ser uma alternativa para fomentar oportunidades de agronegócios, beneficiando a expansão da produção e a geração de emprego e de renda para comunidades litorâneas (SANCHES, 2007).

O litoral brasileiro dispõe de vastos recursos para propiciar o desenvolvimento desta atividade, entretanto, a oferta de formas jovens vem sendo apontada como o fator que mais restringe este desenvolvimento. SANCHES *et al.* (2006), ao demonstrarem a viabilidade econômica do cultivo da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*), apontaram a dificuldade de obtenção de formas

jovens como um dos maiores entraves para o cultivo desta espécie. Desta forma, fica clara a necessidade de desenvolvimento de pesquisas na área de reprodução de peixes marinhos em busca de tecnologia para que possam ser cultivadas.

Importante ferramenta para a reprodução de peixes, a refrigeração do sêmen em temperaturas ao redor de 4°C, prolongando o tempo de viabilidade dos espermatozoides, tem contribuído para o sucesso da reprodução artificial de muitas espécies de peixes. Apesar de pouco utilizada em espécies marinhas no Brasil, resultados positivos de refrigeração de sêmen de peixes marinhos já foram obtidos com *Pogonias cromis* (WAYMAN *et al.*, 1997), *Sciaenops ocellatus* (WAYMAN e TIERSCH, 1998), *Acipenser baeri* (BILLARD *et al.*, 2004), *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004) e *Anguilla anguilla* (PEÑARANDA *et al.*, 2010).

Esta alternativa, de baixo custo, pode simplificar a utilização de machos durante procedimentos de reprodução induzida, facilitando os trabalhos de rotina em um laboratório de reprodução e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas (CARNEIRO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Para tanto, é necessário o conhecimento sobre a utilização de soluções diluidoras e a definição sobre as condições de estocagem do sêmen.

A maioria dos diluentes é baseada na composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos, sendo que diferentes soluções diluidoras têm sido empregadas em experimentos de criopreservação de sêmen de peixes marinhos. A diluição possibilita diminuir a competição entre os espermatozoides por oxigênio e espaço e pode, paralelamente, evitar a iniciação da motilidade espermática (SANCHES *et al.*, 2009). Na enguia européia, *A. anguilla*, o desenvolvimento de um diluente específico para a refrigeração do sêmen da espécie proporcionou melhores resultados na preservação da qualidade espermática e elevação das taxas de fecundação (PEÑARANDA *et al.*, 2010).

Considerando todos estes fatores, a definição de um adequado protocolo de resfriamento do sêmen deve, ainda, ser confirmada pela capacidade de fecundação obtida com o sêmen resfriado, comparativamente ao sêmen fresco.

As técnicas de conservação de sêmen são importantes estratégias para a reprodução induzida, entretanto, poucos trabalhos tem focado estas técnicas para espécies de lutjanídeos, merecendo destaque os resultados obtidos por RILEY *et al.* (2004), com *Lutjanus campechanus*, e VUTHIPHANDCHAI *et al.* (2009), com *Lutjanus argentimaculatus*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação do sêmen do ariocó (*L. synagris*) a curto prazo, através do processo de refrigeração.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Manejo dos Reprodutores

Os exemplares de ariocó (*L. synagris*), em número de 50, oriundos de captura na região litorânea de Ubatuba/SP, realizada entre os meses de outubro e novembro de 2007, foram mantidos em uma densidade de 2 peixes m<sup>-3</sup> em tanques-rede, de 2 m X 2 m x 2 m (8 m<sup>3</sup>), instalados na área costeira da praia do Itaguá, em Ubatuba/SP. Os peixes foram alimentados 1 x ao dia com ração comercial destinada a peixes marinhos (45% PB, 12% E.E.).

### Coleta do Sêmen

No início da temporada reprodutiva (janeiro de 2008), 25 exemplares, em jejum de 24 horas, foram anestesiados (benzocaína a 0,1 g L<sup>-1</sup>) e, em seguida, medidos seu comprimento (cm) e peso (g), sendo o sêmen extraído individualmente de cada peixe (sem a necessidade de indução hormonal) e colhido com o auxílio de seringas plásticas para insulina graduadas (1 mL), envolvidas com papel alumínio, para evitar a incidência da luz ambiente sobre as amostras. A seringa, sem agulha, foi colocada junto a papila urogenital e através de uma leve pressão abdominal, o sêmen foi aspirado pela seringa até aparecer o primeiro sinal de sangue. A medida do volume foi feita diretamente na seringa.

Foram tomados cuidados para evitar a contaminação do sêmen por ocasião da coleta. Os peixes estavam em jejum por 24 horas (evitando a contaminação por fezes), sendo que, antes da coleta, a região abdominal dos exemplares foi lavada com água doce (evitando qualquer risco da água salgada ativar as amostras), e imediatamente

seca com toalhas de papel descartáveis antes de se iniciar a coleta com seringas individuais para cada peixe. Após cada coleta, uma subamostra era observada em microscópio para avaliar se os espermatozóides estavam ativados (caso de contaminação por urina) e, em caso positivo, a amostra era descartada.

### Caracterização do Sêmen Fresco

A avaliação da qualidade seminal foi feita, individualmente, antes de se realizar a mistura do sêmen dos diversos machos, em partes iguais, para a realização dos experimentos de refrigeração. Foram determinados os parâmetros: taxa de motilidade espermática (porcentagem de células da amostra que apresentam movimento progressivo), duração da motilidade espermática (duração da atividade de movimento celular, em segundos) e concentração espermática (número de espermatozóides mL<sup>-1</sup> de sêmen) do sêmen fresco. As análises da motilidade e da duração da motilidade espermáticas foram aferidas simultaneamente na mesma preparação, por um único técnico, usando um único campo focal escolhido aleatoriamente, com intensidade de luz mantida inalterada. Para a ativação do sêmen, foi utilizada uma taxa de diluição de 1:1, idêntica a utilizada por SANCHES *et al.* (2009) e TIBA *et al.* (2009) com outras espécies de peixes marinhos, sendo feita imediatamente após a mistura de sêmen em água marinha (salinidade 35) (15 µL de sêmen:15 µL de água) e observadas sob microscópio óptico, em ampliação de 200x. A motilidade foi estimada subjetivamente, registrando-se a porcentagem das células em movimento de deslocamento visualizadas no campo microscópico. A duração da motilidade foi cronometrada do início da ativação até o momento em que todas as células se tornaram imóveis. A concentração espermática foi avaliada por meio da contagem, sob microscópio (200x), das células espermáticas presentes em amostras de sêmen, previamente diluídas em solução tamponada de formol (5%), preparadas em câmara hematimétrica de Neubauer (1 mm<sup>3</sup>). Comparativamente, para determinação da concentração espermática, foi empregada a técnica de espermátocrito. O sêmen foi colocado em capilares para microhematócrito, com uma das extremidades selada com plastilina, e submetido a

centrifugação em microcentrífuga a 7000 rpm (18000 g) por quinze minutos. Estes valores foram determinados em experimento prévio. Após a centrifugação, a leitura da massa celular foi feita com régua graduada, e os valores obtidos, expressos em porcentagem. Foi estimada a correlação entre o espermatócrito e a concentração espermática.

#### *Experimento I – Refrigeração do sêmen com diferentes diluentes*

Neste experimento foi analisado o efeito de diferentes soluções diluidoras na preservação da motilidade e da duração da motilidade do sêmen resfriado (4°C) por até seis dias (144 horas). Foram empregadas três soluções iônicas baseadas na composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos anteriormente utilizadas, com sucesso, na criopreservação de sêmen de outras espécies marinhas (SANCHES *et al.*, 2009; TIBA *et al.*, 2009):

- Diluente A (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm;

- Diluente B (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm;

- Diluente C (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm.

Foram utilizadas amostras de sêmen de 10 indivíduos, misturadas entre si, em quantidades iguais, que apresentaram motilidade espermática superior a 90%. Foram realizados quatro tratamentos: Controle (sêmen *in natura*, sem diluição); T1 (sêmen + diluente A); T2 (sêmen + diluente B); T3 (sêmen + diluente C). A proporção empregada de sêmen:diluente foi de 1:3 (v/v). Cada tratamento teve três repetições. As amostras (com volume sêmen + diluidor, totalizando 1 ml) foram mantidas em tubos de ensaio de 5 mL, devidamente identificadas e armazenadas em refrigerador (4°C). As amostras foram agitadas a cada quatro horas durante todo o período experimental. A taxa de motilidade e a duração da motilidade espermática de cada unidade experimental foram avaliadas após 0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas de resfriamento a 4°C. O momento 0 h da avaliação foi o imediatamente após a diluição.

#### *Experimento II – Refrigeração do sêmen em atmosfera modificada (100% oxigênio)*

Neste experimento foi analisado o efeito de diferentes soluções diluidoras na preservação da motilidade e na duração da motilidade do sêmen resfriado (4°C) por até dois dias utilizando atmosfera modificada (exclusivamente oxigênio). Foram empregadas as mesmas soluções diluentes do experimento anterior.

Foi utilizada uma mistura de partes iguais de sêmen de 10 indivíduos, (os mesmos do experimento anterior), com taxa de motilidade espermática superior a 90%. Foram realizados quatro tratamentos: Controle (sêmen *in natura*, sem diluição); T1 (sêmen + diluente A); T2 (sêmen + diluente B); T3 (sêmen + diluente C). A proporção empregada de sêmen:diluente foi de 1:3 (v/v). Cada tratamento teve três repetições. As amostras (com volume sêmen + diluidor, totalizando 1 ml) foram mantidas em tubos de ensaio de 5 mL, devidamente identificadas e armazenadas em refrigerador (4°C). Todas as amostras foram seladas em um saco plástico (com capacidade de 60 litros), que foi mantido inflado com oxigênio puro. As amostras foram agitadas a cada quatro horas durante todo o período experimental. A taxa de motilidade e a duração da motilidade espermática de cada unidade experimental foram avaliadas após 0, 12, 24 e 48 horas de resfriamento a 4°C. O momento 0 h da avaliação foi o imediatamente após a diluição.

#### *Experimento III – Capacidade de Fertilização do Sêmen Refrigerado*

Os testes de fertilidade do sêmen fresco e refrigerado por 24 e 48 horas foram realizados simultaneamente, inseminando ovócitos oriundos de uma mesma fêmea. A fêmea foi injetada com uma dose única de LH-RHa (50 µg kg<sup>-1</sup>) (SIGMA, EUA). Para este experimento foi utilizado um “pool” de partes iguais de sêmen de três machos. Este sêmen foi diluído com o diluente A e submetido à refrigeração em atmosfera normal por 24 e 48 horas.

A liberação dos ovócitos maduros teve início, aproximadamente, 36 horas após injeção do hormônio, momento em que foi feita a extrusão para os testes de fertilização a seco. Os ovócitos foram recolhidos em bandejas plásticas e divididos

em 30 lotes (parcelas), contendo aproximadamente 1.000 ovócitos lote<sup>-1</sup>, sendo distribuídos em recipientes plásticos de 50 mL para a fertilização, simultânea, de 10 lotes com sêmen fresco, 10 lotes com sêmen refrigerado por 24 horas e 10 lotes com sêmen refrigerado por 48 horas. O sêmen fresco, antes de ser misturado, foi diluído no mesmo diluente (diluente A) e na mesma proporção utilizados para diluir o sêmen refrigerado.

Após a mistura do sêmen com os ovócitos (0,05 mL de sêmen para cada 1.000 ovócitos), foi adicionada 20 mL de água marinha (salinidade 35) para ativar os espermatozóides e iniciar a fecundação. O material correspondente a cada parcela foi posteriormente depositado em incubadoras individuais (volume de um litro), feitas com tubos de PVC e fechadas na extremidade inferior por uma tela de 500 µm, mantidas flutuando dentro de tanque com circulação contínua de água marinha e temperatura de 28°C. A taxa de fertilização, calculada com base na relação entre o número de ovos fertilizados e o número total de ovos, foi estimada quatro horas após a fertilização, no estágio de gástrula. Para estimar a taxa de fertilização, os ovos foram contados em três subamostras de 100 ovos em cada incubadora, sendo aplicada a seguinte equação: Taxa de

fertilização = número de ovos em divisão / número total de ovos contados.

#### Análise dos Dados

Para análise estatística de todos os experimentos foi utilizado o SAS (Statistical Analyses System, o SAS/STAT, versão 6.11 de 1990) (SAS INSTITUTE INC., 1990). Os dados das taxas de motilidade e taxas de fertilização sofreram transformação angular, antes da análise estatística. A correlação entre espermátócrito e concentração espermática foi determinada por análise de regressão linear. Todos os dados foram testados para normalidade e homogeneidade das variâncias. A análise de variância foi efetuada pelo procedimento ANOVA. Posteriormente, para verificação de diferenças significativas, foi aplicado o teste de variação múltipla de Tukey. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes (ZAR, 1999).

## RESULTADOS

#### Caracterização do sêmen fresco

Os resultados da análise das características do sêmen são apresentados na Tabela 1. Uma relação positiva foi encontrada entre o espermátócrito e a concentração espermática (Figura 1).

**Tabela 1.** Médias e desvios padrão de comprimento total (cm), peso total (g), volume (mL), concentração (células mL<sup>-1</sup>), espermátócrito (mm), taxa de motilidade (%) e duração da motilidade (segundos) espermáticas do ariocó *Lutjanus synagris* (n = 25)

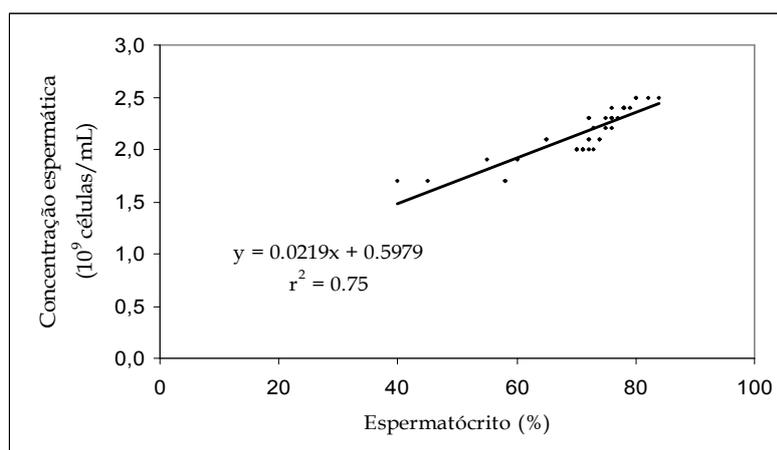
Características do sêmen fresco						
Comprimento total (cm)	Peso total (g)	Volume (mL)	Concentração (x 10 <sup>9</sup> células mL <sup>-1</sup> )	Espermátócrito (%)	Taxa de motilidade (%)	Duração da motilidade (segundos)
27,4 ± 4,6	336,3 ± 171,4	0,61 ± 0,35	2,2 ± 0,2	73,4 ± 4,8	100 ± 0	137 ± 20

#### Experimento I – Refrigeração do sêmen

Para as análises de viabilidade espermática, foi considerada a premissa de MARQUES e GODINHO (2004) como limite para utilização do sêmen; uma taxa de motilidade espermática de no mínimo 30%.

Os resultados deste experimento, em relação à motilidade espermática, indicaram que o sêmen fresco, sem a adição de diluentes, diferiu significativamente ( $P < 0,05$ )

do sêmen com adição de diluentes, apresentando baixa taxa de motilidade (inferior a 24 horas) quando submetido ao processo de refrigeração. Foi observado, também, que tanto o diluente A como o diluente B foram eficientes em preservar a motilidade espermática (acima de 30%) por até 72 horas, não diferindo entre si, porém diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) do diluente C, que manteve a motilidade (acima de 30%) por apenas 24 horas (Tabela 2).



**Figura 1.** Correlação entre concentração espermática (células mL<sup>-1</sup>) e espermatócrito (%) para o sêmen do ariocó *Lutjanus synagris* (n = 25, P<0,05)

**Tabela 2.** Taxa de motilidade (%; média ± desvio-padrão) do sêmen de *Lutjanus synagris* (n = 10 machos, 3 replicatas por tratamento) submetido à refrigeração a 4°C, diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes

Diluidores	Tempo de Resfriamento (h)					
	0	12	24	48	72	144
A (pH 6,1)	98 ± 3aA	93 ± 3aA	93 ± 3aA	67 ± 6aB	63 ± 6aB	27 ± 6aC
B (pH 7,8)	98 ± 3aA	95 ± 0aA	93 ± 3aA	70 ± 0aB	63 ± 6aB	7 ± 3 bC
C (pH 8,2)	98 ± 3aA	95 ± 0aA	80 ± 0bB	17 ± 6bC	5 ± 0bD	0 ± 0cD
Sêmen não diluído	98 ± 3aA	38 ± 4bB	0 ± 0cC	-	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, apresentam diferenças significativas (teste de Tukey, P<0,05);

Diluyente A (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm;

Diluyente C (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm

Em relação à duração da motilidade espermática, o sêmen fresco não suportou o rigor do processo de refrigeração, apresentando queda brusca do parâmetro analisado em apenas 12 horas.

O sêmen acrescido do diluyente A diferiu dos demais tratamentos (P<0,05), não apresentando expressiva diminuição da duração da motilidade por até 144 horas de refrigeração (Tabela 3).

**Tabela 3.** Duração da motilidade (segundos; média ± desvio-padrão) do sêmen de *Lutjanus synagris* (n = 10 machos, 3 replicatas por tratamento) submetido à refrigeração a 4°C, diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes

Diluidores	Tempo de resfriamento (h)					
	0	12	24	48	72	144
A (pH 6,1)	174 ± 23aB	262 ± 36aA	215 ± 26aA	274 ± 94aA	274 ± 44aA	248 ± 2aA
B (pH 7,8)	174 ± 23aB	234 ± 30aA	214 ± 40aA	161 ± 19bB	172 ± 7bB	160 ± 21bB
C (pH 8,2)	174 ± 23aB	249 ± 24aA	136 ± 13bC	76 ± 12cD	66 ± 4cD	0 ± 0cE
Sêmen não diluído	174 ± 23aA	41 ± 2bB	0 ± 0cC	-	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, apresentam diferenças significativas (teste de Tukey, P<0,05);

Diluyente A (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm;

Diluyente C (g L<sup>-1</sup>) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm

**Experimento II – Refrigeração do sêmen em atmosfera modificada (100% oxigênio)**

Neste experimento, tanto em relação à motilidade como à duração da motilidade espermática, houve uma significativa queda na qualidade seminal, não sendo possível obter

tempos de refrigeração superiores a 12 horas com resultados significativos de sobrevivência espermática. A adição de diluentes ao sêmen, comparativamente ao sêmen fresco, diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ), entretanto, não foram observadas diferenças entre os diferentes diluentes (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4.** Taxa de motilidade (%; média  $\pm$  desvio-padrão) do sêmen de *Lutjanus synagris* (n=10 machos, 3 replicatas por tratamento) submetido a refrigeração a 4°C, em atmosfera modificada (100% oxigênio), diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes

Diluidores	Tempo de resfriamento (h)			
	0	12	24	48
A (pH 6,1)	100 $\pm$ 0aA	27 $\pm$ 12aB	5 $\pm$ 5aC	0 $\pm$ 0aC
B (pH 7,8)	100 $\pm$ 0aA	32 $\pm$ 6aB	10 $\pm$ 0aC	0 $\pm$ 0aC
C (pH 8,2)	100 $\pm$ 0aA	25 $\pm$ 4aB	10 $\pm$ 0aC	0 $\pm$ 0aC
Sêmen não diluído	100 $\pm$ 0aA	0 $\pm$ 0bB	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ );

Diluyente A ( $g L^{-1}$ ) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B ( $g L^{-1}$ ) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm;

Diluyente C ( $g L^{-1}$ ) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm

**Tabela 5.** Duração da motilidade (segundos; média  $\pm$  desvio-padrão) do sêmen de *Lutjanus synagris* (n=10 machos, 3 replicatas por tratamento) submetido a refrigeração a 4°C, em atmosfera modificada (100% oxigênio), diluído 1:3 (v/v) em diferentes diluentes

Diluidores	Tempo de resfriamento (h)			
	0	12	24	48
A (pH 6,1)	176 $\pm$ 8aA	95 $\pm$ 8aB	44 $\pm$ 12aC	0 $\pm$ 0aD
B (pH 7,8)	176 $\pm$ 8aA	115 $\pm$ 14aB	66 $\pm$ 8aC	0 $\pm$ 0aD
C (pH 8,2)	176 $\pm$ 8aA	117 $\pm$ 20aB	55 $\pm$ 10aC	0 $\pm$ 0aD
Sêmen não diluído	176 $\pm$ 8aA	0 $\pm$ 0bB	-	-

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ );

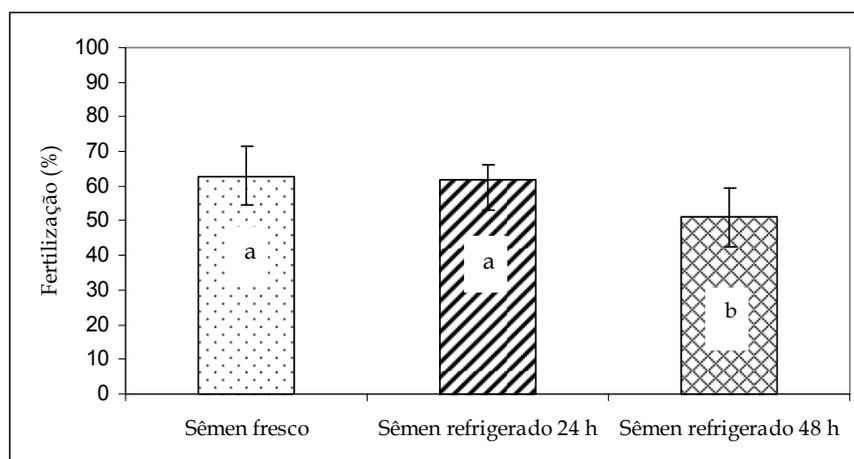
Diluyente A ( $g L^{-1}$ ) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266; pH 6,1 ; 158 mOsm; Diluyente B ( $g L^{-1}$ ) = NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2; pH 7,8 ; 157 mOsm;

Diluyente C ( $g L^{-1}$ ) = NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84; pH 8,2 ; 172 mOsm

**Experimento III - Capacidade de fertilização do sêmen refrigerado**

Na Figura 2 pode ser observado que a taxa de fertilização do sêmen fresco (63%) não foi

significativamente diferente ( $P > 0,05$ ) da obtida com o uso de sêmen refrigerado por 24 horas (62%); entretanto, ambas diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) do tratamento que utilizou sêmen refrigerado por 48 horas (51%).



**Figura 2.** Taxas de fertilização (médias  $\pm$  desvio-padrão) com sêmen fresco e sêmen diluído no diluente A e refrigerado a 4°C por 24 e 48 horas em ovócitos de uma fêmea de *Lutjanus synagris*. a-b Colunas com letras distintas apresentam diferenças significativas (teste de Tukey,  $P < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

### Características do sêmen fresco

Os dados obtidos na avaliação do sêmen *in natura* de *L. synagris* apontaram uma taxa de motilidade de 100% e uma duração da motilidade de  $137 \pm 20$  segundos. A concentração espermática média foi de  $2,2 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ , sendo o volume médio colhido de  $0,61 \pm 0,35$  mL. Comparando estes resultados com outras espécies de lutjanídeos, RILEY *et al.* (2004) obteve para *L. campechanus* concentração espermática de  $1,0 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  e VUTHIPHANDCHAI *et al.* (2009), para *L. argentimaculatus*, de  $1,3$  a  $2,8 \times 10^{10}$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Estes autores não fazem referência a outras características seminais, impossibilitando comparações. Paralelamente, em diferentes espécies marinhas são encontrados resultados distintos. TIBA *et al.* (2009) obtiveram, para o robalo peva *Centropomus parallelus*, uma concentração espermática de  $2,5 \times 10^{10}$  células  $\text{mL}^{-1}$ , duração da motilidade de 464 segundos, volume de sêmen de 1,9 mL, com peixes de peso médio de 699 gramas. SANCHES *et al.* (2009), avaliando a garoupa-verdadeira *E. marginatus*, obtiveram concentração espermática de  $3,1 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ , duração da motilidade de 3060 segundos, volume de 0,36 mL, em peixes com peso médio de 1378 gramas. SUQUET *et al.* (2000) obtiveram, para *Scophthalmus maximus*, concentração espermática  $1,1 \times 10^{10}$  células  $\text{mL}^{-1}$  e

volume de sêmen entre 0,2 a 2,2 mL, em peixes com peso entre 1,4 a 3,2 kg. Em outra espécie de linguado, *Paralichthys orbignyanus*, estudada por LANES *et al.* (2008), foi encontrada concentração espermática  $1,1 \times 10^{10}$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Segundo GODINHO (2000), diferenças na concentração espermática podem ser devido a espécie, idade dos peixes e fatores ambientais (variações ao longo da estação de desova), sendo que o volume de sêmen produzido pelos peixes pode ser muito variável, dependendo do tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta.

A técnica do espermátocrito mostrou-se adequada para o uso rotineiro em avaliação de concentração espermática de *L. synagris*. CRUZ-CASALLAS *et al.* (2006) e AGARWAL e RAGHUVANSHI (2009) recomendam a utilização da técnica do espermátocrito, como método indireto, para avaliação da concentração espermática por ser um procedimento prático, pouco trabalhoso e com grande confiabilidade, fato comprovado neste estudo realizado com esta espécie de lutjanídeo.

### Refrigeração do sêmen

Resultados positivos de refrigeração de sêmen foram obtidos com poucas espécies marinhas, com destaque para *P. cromis* (WAYMAN *et al.*, 1997), *S. ocellatus* (WAYMAN e TIERSCH, 1998), *A. baeri* (BILLARD *et al.*, 2004),

*C. undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004) e *A. anguilla* (PEÑARANDA *et al.*, 2010). Todos estes autores observaram uma queda gradual na viabilidade do sêmen ao longo do tempo, semelhante a observada no presente estudo.

Os diluentes apresentam primordial importância em manter os espermatozoides imobilizados, sendo desenvolvidos para que, durante os procedimentos de refrigeração, 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). Segundo MUCHLISIN (2005), diversos diluentes com distintas formulações iônicas vem sendo empregados para a conservação do sêmen de peixes marinhos, sendo uma tendência o desenvolvimento de diluentes específicos para cada espécie.

A utilização de sêmen sem a adição de diluentes e submetido ao processo de refrigeração tem apresentado pouco sucesso, com expressiva perda da qualidade seminal após poucas horas. Estudando *Latris lineata*, RITAR e CAMPET (2000) observaram que a motilidade do sêmen fresco, armazenado sem diluição, a 5°C, pode ser mantida por dois dias quando o sêmen praticamente não apresentava motilidade, comprovando a baixa sobrevivência do sêmen submetido à refrigeração sem incorporação de diluentes. TIERSCH *et al.* (2004), avaliando a refrigeração do sêmen do robalo-flecha, *C. undecimalis*, observaram que a sobrevivência espermática foi inferior a 24 horas quando não se acrescentava diluente ao sêmen. O sêmen do ariocó, sem a adição de diluentes e submetido ao processo de refrigeração, também apresentou redução significativa da taxa de motilidade. Embora poucos estudos tenham abordado esta questão, estes resultados reforçam a necessidade do estudo da composição de diluentes e sua influência no processo de refrigeração do sêmen de peixes marinhos.

Diversos autores (LAHNSTEINER *et al.*, 1997; CHEREGUINI *et al.*, 2001) reportaram uma significativa correlação entre o pH do plasma seminal e a motilidade espermática, sugerindo que o pH possa ser uma importante característica do plasma seminal que influencie a motilidade espermática.

Segundo TANAKA *et al.* (2002), a motilidade espermática pode ser reduzida quando o diluente contiver bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). Estes autores concluíram que a inibição da motilidade pode estar relacionada a dissociação do bicarbonato de sódio em soluções aquosas e que a razão desta dissociação é altamente dependente do pH do meio aquoso.

O bicarbonato de sódio, convertido pela anidrase carbônica, em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) e carbonato (HCO<sub>3</sub>) influenciam o pH intracelular dos espermatozoides e, de acordo com ODA e MORISAWA (1993), afetam a motilidade espermática em teleosteos marinhos. TANAKA *et al.* (2002) demonstraram que o CO<sub>2</sub> (proveniente da dissociação do bicarbonato de sódio) diminui a motilidade espermática. Confirmando isto, GARZÓN *et al.* (2008) observaram que modificações nas concentrações de bicarbonato de sódio dos diluentes resultavam em redução na motilidade espermática na enguia europeia (*A. anguilla*).

Os diluentes utilizados no presente estudo já vem sendo utilizados com sucesso na conservação de sêmen de peixes marinhos (SANCHES *et al.*, 2009; TIBA *et al.*, 2009) e se diferenciam por sua composição iônica e valores de pH. O diluente A (pH 6,1) difere dos demais diluentes pela ausência de bicarbonato de sódio, presente no diluente B e em maior quantidade no diluente C, o que explicaria o melhor desempenho do diluente A no processo de refrigeração do sêmen do ariocó.

Considerando a questão da osmolaridade dos diluentes, WAYMAN *et al.* (1997), avaliando a refrigeração do sêmen de *P. cromis*, observaram que diluentes com baixos valores de osmolaridade (<200 mOsm) apresentavam melhores resultados na preservação da qualidade espermática. Resultados positivos no uso de diluentes com baixa osmolaridade na refrigeração do sêmen de peixes marinhos também foram obtidos por WAYMAN e TIERSCH (1998) ao conseguirem preservar a motilidade do sêmen de *S. ocellatus*, submetido ao processo de refrigeração, utilizando diluente HBSS (200 mOsm). Com este mesmo diluente, a qualidade seminal do robalo-flecha *C. undecimalis* foi mantida por nove dias (TIERSCH

*et al.*, 2004). ALAVI *et al.* (2004), avaliando diferentes diluentes com diferentes osmolaridades na preservação da qualidade seminal do esturjão, *A. persicus*, obtiveram melhores resultados com diluentes com valores de osmolaridade inferiores a 200 mOsm. No presente estudo, os três diluentes avaliados apresentavam osmolaridade inferior a 200 mOsm, entretanto, foi possível observar que outros fatores, tais como o valor do pH, e não somente a osmolaridade dos diluentes, afetaram a motilidade espermática durante o processo de refrigeração do sêmen do ariocó.

Outro ponto a ser destacado foi o aumento da duração da motilidade espermática quando empregado o diluente A no processo de refrigeração do sêmen do ariocó. Segundo STOSS (1983), diluentes com adequadas composições iônicas podem prolongar o tempo de motilidade espermática. Aparentemente, isto foi possível pela sustentação de um novo microambiente aos espermatozoides, distinto do ambiente fisiológico proporcionado pelo plasma seminal, fato já reportado por TIBA *et al.* (2009) para o robalo-peva, *C. parallelus*. De acordo com INABA (2003), os constituintes iônicos do diluente podem interagir com os constituintes químicos das estruturas internas do flagelo, responsáveis pela excitação do espermatozoide, elevando o padrão de tempo de motilidade. Não foram localizados na literatura trabalhos sobre o tempo de fechamento da micrópila dos ovócitos desta espécie, o que impede uma definição sobre qual seria a duração ideal da motilidade deste sêmen. Embora poucos estudos tenham abordado esta questão para peixes marinhos, a vantagem no prolongamento da duração da motilidade espermática reside em ampliar a capacidade de fertilização do sêmen, pelo fato dos espermatozoides disporem de mais tempo para alcançarem os ovócitos, entretanto, seria recomendável estudos sobre esta questão, já que, no caso da garoupa-verdadeira, *E. marginatus*, a duração da motilidade do sêmen pode chegar a mais de setenta minutos (SANCHES *et al.*, 2009).

#### *Uso do oxigênio durante a refrigeração do sêmen*

A questão da preservação da qualidade espermática, submetendo o sêmen a uma

atmosfera exclusiva de oxigênio durante o processo de refrigeração, ainda é pouco esclarecida para diversas espécies de peixes. BENCIC *et al.* (2000) consideram o oxigênio essencial, quando empregada a refrigeração na manutenção da qualidade espermática em salmonídeos, corroborado por BILLARD *et al.* (2004), que afirmaram que um ponto crítico na refrigeração do sêmen é a disponibilidade de oxigênio para as células espermáticas, sendo expressiva a perda da motilidade quando o sêmen é estocado em condições de anoxia. Resultados expressivos foram obtidos por DILAURO *et al.* (1994), ao reportarem 99% e 40% de motilidade espermática após 5 e 17 dias, respectivamente, no sêmen do esturjão do Atlântico, *A. oxyrinchus*, quando mantido sob refrigeração em tubos com oxigênio puro. Entretanto, SAAD *et al.* (1988) demonstraram que a incubação de sêmen da carpa (*Cyprinus carpio*) com oxigênio não produziu vantagem sobre aquele estocado em contato com o ar. CHEREGUINI *et al.* (1997), comparando a refrigeração do sêmen do linguado, *S. maximus* (espécie marinha), em atmosfera normal e duas diferentes atmosferas (100% oxigênio e 100% nitrogênio) observaram que, após 20 horas, a taxa de motilidade foi significativamente mais alta em atmosfera normal, ocorrendo queda brusca da taxa de motilidade quando utilizada atmosfera modificada. Resultado similar foi obtido por MARQUES e GODINHO (2004), que não encontraram diferenças na viabilidade espermática (motilidade e duração da motilidade espermática) de seis espécies de peixes tropicais de água doce do Brasil quando o sêmen foi mantido conservado sob refrigeração utilizando-se, comparativamente, atmosfera normal e oxigênio puro.

No presente estudo, não houve vantagem na utilização de uma atmosfera de 100% oxigênio durante o processo de refrigeração do sêmen de *L. synagris*. Tanto a taxa de motilidade como a duração da motilidade espermática ficaram muito aquém dos obtidos com atmosfera normal.

#### *Capacidade de fertilização do sêmen refrigerado*

Os resultados na taxa de fertilização com sêmen refrigerado (por 24 ou 48 horas) obtidos neste estudo foram muito expressivos, contribuindo positivamente para os procedimentos de reprodução induzida desta

espécie. Embora os valores das taxas de fertilização tenham sido relativamente baixos (ao redor de 60%), acreditamos que tal fato se deva a fêmea utilizada ser jovem (primeira maturação) e a ausência da informação da relação ideal espermatozóide:ovócito (que não foi determinada neste estudo, sendo altamente interessante de ser abordada em estudos futuros com esta espécie). Entretanto, a taxa de fertilização obtida com o sêmen refrigerado por 48 horas (51%), embora inferior a obtida com o sêmen fresco (62%), ainda pode ser considerada uma boa alternativa, considerando-se a praticidade e a ampliação do tempo de armazenagem do sêmen para os procedimentos de reprodução induzida desta espécie. Taxas de fertilização entre 26 a 61% foram obtidas para o sêmen de curimatá, *Prochilodus lineatus*, diluído e resfriado por quatro dias (ORFÃO *et al.*, 2010). Taxas de fertilização ao redor de 70% (utilizando-se sêmen fresco) foram obtidas com diferentes espécies de lutjanídeos (RILEY *et al.*, 2004; VUTHIPHANDCHAI *et al.*, 2009), valores pouco superiores aos obtidos com *L. synagris*, o que demonstra a viabilidade do emprego de sêmen refrigerado desta espécie com o protocolo aqui desenvolvido.

## CONCLUSÃO

A refrigeração do sêmen de *L. synagris* é uma alternativa viável para a conservação de curto prazo, sendo possível, utilizando-se o diluente A ou B, manter por até 48 horas uma adequada qualidade espermática. Não há vantagens na utilização de atmosfera modificada (100% oxigênio) na refrigeração do sêmen desta espécie. O sêmen refrigerado por 48 horas possibilita uma taxa de fertilização superior a 50%, podendo ser utilizado nos procedimentos de reprodução induzida desta espécie.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N.K. e RAGHUVANSHI, S.K. 2009 Spermocrit and sperm density in snowtrout (*Schizothorax richardsonii*): correlation and variation during the breeding season. *Aquaculture*, Amsterdam, 291(4): 61-64.
- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.; KARAMI, M.; AMIRI, B.M. 2004 Spermatozoa motility in the Persian sturgeon: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction Research*, Baton Rouge, 128(1): 819-828.
- BENCIC, D.C.; KRISFALUSI, M.; CLOUD, J.G.; INGERMANN, R.L. 2000 Short-term storage of salmonid sperm in air versus oxygen. *North American Journal of Aquaculture*, New York, 62(1): 19-25.
- BILLARD, R.; COSSON, S.B.; NOVIERI M.; POURKAZEMI, M. 2004 Cryopreservation and short-term storage of sturgeon: a review. *Aquaculture*, Amsterdam, 236(1): 1-9.
- CARNEIRO, P.C.F; SEGUI, M.S.; IÓRIS FILHO, C.R.; MIKOS, J.D. 2006 Viabilidade do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen* armazenado sob refrigeração. *Revista Acadêmica*, Belo Horizonte, 4(3): 11-16.
- CHEREGUINI, O.; CAL, R.M.; DREANNO, C.; BAULNY, B.O.; SUQUET, M.; MAISSE, G. 1997 Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources*, Paris, 10: 251-255.
- CHEREGUINI, O.; BANDA, I.G. DE LA; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. 2001 Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. *Aquaculture Reserch*, Oxford, 32(1): 133-143.
- CLARO, R. e LINDEMAN, K.C. 2008 *Biología y manejo de los pargos (Lutjanidae) en el Atlántico occidental*. Havana: Instituto de Oceanología/CITMA. 472 p.
- CRUZ-CASALLAS, P.E.; VELASCO-SANTAMARIA, Y.M.; MEDINA-ROBLES, V.M. 2006 Determinación del espermatocrito y efecto del volumen de la dosis semillante sobre la fertilidad en yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Bogotá, 19(2): 140-145.
- DILAURO, M.N., KRISE, W.F., HENDRIX, M.A., BAKER, S.E. 1994 Short term storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish-Culturist*, New York, 56(1): 143-144.
- FIGUEIREDO, J.L. e MENEZES, N.A. 2000 *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia/USP. 116p.
- 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 cryopreservation of european eel sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, Madri, 43: 99-105.
- GODINHO, H.P. 2000 Criopreservação de sêmen de peixes. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 21(3): 16-20.
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p.138-160.
- INABA, K. 2003 Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological Science*, Londres, 20: 1043-1056.
- KLIPPEL, S. e PERES, M.B. 2002 *Resultados da avaliação de estoques das dez principais espécies na pesca de linha de mão da costa central do Brasil*. Rio Grande: Programa REVIZEE. 60p.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. 1997 Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2ml and 5ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, Oxford, 28(2): 471-479.
- LANES, C.F.C.; OKAMOTO, M.; CAVALCANTI, P.V.; COLARES, T.; CAMPOS, V.F.; DESCHAMPS, J.C.; ROBALDO, R.B.; MARINS, L.F.; SAMPAIO, L.A. 2008 Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, Amsterdam, 275(1): 361-365.
- MARQUES, S. e GODINHO, H.P. 2004 Short-term cold storage of sperm from six tropical characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Maringá, 47(5): 799-804.
- MUCHLISIN, Z.A. 2005 Current Status of Extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas*, Halam, 6(1): 66-69.
- ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N.; NASCIMENTO, A.F.; ISAÚ, Z.A.; VIVEIROS, A.T.M. 2010 Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research*, Oxford, 41: 679-687.
- ODA, S. e MORISAWA, M. 1993 Rises of intracellular Ca<sup>+</sup> and pH mediate the initiation of sperm of farmed european eel *Anguilla anguilla*. *Journal of World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 35: 240-246.
- OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. FREITAS, R.T.F.; IZAÚ, Z.A. 2007 Sucesso do resfriamento e congelamento do sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 59(6): 1509-1515.
- PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; GALLEGOS, V.; BARRERA, R.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. 2010 European eel sperm diluent for short-term storage. *Reproduction in Domestic Animals*, Madri, 45: 407-415.
- REZENDE, S.M.; FERREIRA, B.P.; FREDOU, T. 2003 A pesca de lutjanídeos no nordeste do Brasil: histórico das pescarias, características das espécies e relevância para o manejo. *Boletim Técnico Científico do CEPENE*, Recife, 11: 1-17.
- RILEY, K.L.; HOLLADAY, C.G.; CHESNEY, E.J.; TIERSCH, T.R. 2004 Cryopreservation of sperm of red snapper *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 238(1): 183-194.
- RITAR, A.J. e CAMPET, M. 2000 Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trupeter (*Latris lineata*). *Theriogenology*, Amsterdam, 54(1): 467-480.
- SAAD, A.; BILLARD, R.; THERON, M.C.; HOLLEBECQ, M.G. 1988 Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, Amsterdam, 71(1): 133-150.
- SANCHES, E.G.; HENRIQUES, M.B.; FAGUNDES, L.; SILVA, A.A. 2006 Viabilidade econômica do cultivo da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) em tanques-rede, região sudeste do Brasil. *Informações Econômicas*, São Paulo, 36(8): 15-25.
- SANCHES, E.G. 2007 Piscicultura marinha no Brasil: uma alternativa de produção e

- conservação. *Aquicultura e Pesca*, São Paulo, 36: 16-22.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C. 2009 Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 35(3): 389-399.
- SAS INSTITUTE INC. 1990 *SAS technical report. Release 6.11*. Cary: NC. 229p.
- 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., DREANNO, C.; FAUVEL, C., COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, Oxford, 31(1): 231-243.
- TANAKA, S.; ZHANG, H.; YAMADA, Y.; OKAMURA, A.; HORIE, N.; UTOH, T., MIKAWA, N.; OKA, H.P.; KUROKURA, H. 2002 Inibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. *Journal of Fish Biology*, Londres, 60: 139-146.
- TIBA, R.M.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S.; OSTINI, S. 2009 Diluentes e proporções sêmen:diluyente na crioconservação do sêmen do robalo-peva *Centropomus parallelus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 35(1): 99-110.
- 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* (Block). *Aquaculture Research*, Oxford, 35(1): 278-288.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; CHOMPHUTHAWACH, S.; NIMRAT, S. 2009 Cryopreservation of red snapper *Lutjanus argentimaculatus* sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity. *Theriogenology*, Amsterdam, 72(1): 129-138.
- WAYMAN, W.R.; THOMAS, R.G. TIERSCH, T.R. 1997 Refrigerated storage and cryopreservation of black drum *Pogonias cromis* spermatozoa. *Theriogenology*, Amsterdam, 47(1): 1519-1529.
- WAYMAN, W.R. e TIERSCH, T.R. 1998 Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquaculture Research*, Oxford, 29(1): 267-273.
- ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical analysis*. USA: Ed. Prentice Hall. 929 p.