

BIOTÉCNICAS APLICADAS A REPRODUÇÃO DE CIPRINÍDEOS

[Biotechs applied the reproduction of cyprinids]

Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley^{1*}, Francisco Renan Aragão Linhares², Maria Audália Marques de Carvalho³, Mayara Setúbal Oliveira⁴, José Ferreira Nunes⁵

¹ Profa. Doutora Adjunta da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). * Autor para correspondência: E-mail: sandra.salmito@uece.br.

² Doutorando em Reprodução e Sanidade Animal pelo PPGCV – UECE.

³ Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – UECE.

⁴ Mestranda em Reprodução e Sanidade Animal pelo PPGCV – UECE.

⁵ Prof. Doutor Titular da Universidade Estadual do Ceará e Pesquisador do PPGCV.

RESUMO - Esta revisão relata as variações de cada etapa que abrange o processo de criopreservação seminal e fertilização assistida artificial em ciprinídeos. Os diluidores mais utilizados para a criopreservação do sêmen de carpa são uma combinação de sais e açúcares associados aos crioprotetores DMSO ou metanol. Para o armazenamento em nitrogênio líquido as amostras podem ser envasadas em palhetas de diferentes volumes e congeladas em caixas térmicas de poliestireno, refrigeradores programáveis, *dry shippers* ou botijões criogênicos. Após o descongelamento, uma alíquota do sêmen criopreservado é retirada para o cálculo da dose inseminante e realização da fertilização assistida artificial. Em seguida, os ovos fertilizados são tratados com uréia, NaCl e ácido tânico e transferidos para um sistema de incubação. Diante de uma variedade de protocolos relatados pela literatura, ainda é fundamental o aperfeiçoamento continuado destas biotécnicas para permitir o aprimoramento dos programas de reprodução de ciprinídeos.

Palavras-chave: *Cyprinus sp*; criopreservação seminal; fertilização assistida.

ABSTRACT - This review reports the variations of each stage which covers the process of sperm cryopreservation and artificial fertilization in cyprinids. The most commonly used extenders for sperm cryopreservation of carp are a combination of salts and sugars associated with DMSO or methanol. The samples can be packaged in straws of different volumes for storage in liquid nitrogen and frozen in styrofoam boxes, computer-controlled freezer, dry shippers or cryogenic vessel. After thawing an aliquot of cryopreserved semen is taken for the calculation of insemination dose and realization of artificial assisted fertilization. Then fertilized eggs are treated with urea, NaCl and tannic acid and transferred to incubation system. Faced with a variety of protocols reported in the literature, it is still essential to continued improvement of these biotechnologies to enable the improvement of breeding programs for cyprinids.

Keywords: *Cyprinus sp*; sperm cryopreservation; artificial fertilization.

INTRODUÇÃO

Constatando a pobreza da ictiofauna do semiárido nordestino, o brasileiro Rodolfo von Ihering, diretor da Comissão Técnica de Piscicultura do Nordeste, passou a estudar inúmeras espécies de outras bacias hidrográficas, a partir de 1935, com o objetivo de serem introduzidas na região. Dentre as espécies de alto valor comercial, destaca-se a carpa comum (*Cyprinus carpio* vr *hungaricus*), trazida da Hungria em 1986 (DNOCS, 2009).

Nesse contexto, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas de base como a indução hormonal e a reprodução artificial em cativeiro vem contribuindo

para aumentar a produção de pescado, permitindo o crescimento deste setor mundialmente. Outra biotécnica reprodutiva bastante difundida em peixes é a criopreservação seminal. Em todo o mundo, já foram desenvolvidos protocolos de criopreservação de sêmen para mais de 200 espécies de pescado (Tiersch et al., 2007). Na carpa comum, são inúmeros os protocolos de criopreservação e fertilização assistida que visam a sua produção.

Assim, diante da importância da aplicação destas biotécnicas, este artigo apresentará uma revisão sobre o conhecimento atual das técnicas de

criopreservação seminal e fertilização assistida utilizadas na produção de ciprinídeos.

CRIOPRESERVAÇÃO

Desde que Blaxter (1953) realizou os primeiros estudos de criopreservação de gametas de peixes, muitas pesquisas têm sido voltadas para a criopreservação do sêmen de várias espécies de pescado, incluindo a carpa comum (*Cyprinus carpio*). A introdução desta biotécnica na reprodução animal contribuiu para aumentar a propagação de material genético de alto valor em menor espaço de tempo.

A execução de um protocolo de criopreservação de sêmen incluem ajustes de taxas de diluição, escolhas de diluentes e crioprotetores, tempo de equilíbrio entre o crioprotetor e os espermatozoides, método de envase adequado, taxas de resfriamento e taxas de descongelamento das amostras. Diante da presença de várias etapas e suas interações surgem dificuldades para a padronização de protocolos de congelamento seminal (Yang & Tiersch, 2009). Nesse contexto, abordaremos as variações de cada etapa que abrange o processo de criopreservação seminal de carpa comum encontradas na literatura nos últimos anos.

DILUIÇÃO SEMINAL

Os espermatozoides, quando submetidos às alterações rigorosas de temperaturas, estão sujeitos a danos ocasionados pelo frio, denominados crioinjúrias (Silva & Guerra, 2011). Estes danos podem levar a um decréscimo nas características espermáticas, como a velocidade, motilidade, capacidade de fertilização e subsequente redução das taxas de eclosão (Li et al., 2010). Dessa forma, após a coleta, o sêmen é submetido à etapa de diluição resultante da adição de soluções protetoras capazes de minimizar os danos causados pelas crioinjúrias. Estas soluções são chamadas de crioprotetores, atuando na diminuição do ponto de congelamento da água, reduzindo o estresse osmótico e os efeitos da cristalização sobre a estrutura celular (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Devido à especificidade própria de cada grupo animal, torna-se fundamental a adequação da composição do diluidor as características seminais de cada espécie. Na literatura são relatadas soluções contendo apenas sais, apenas açúcares ou uma combinação dos mesmos para a criopreservação seminal de peixes. A solução de Alsever, cuja composição é formada por NaCl e citrato de sódio, é considerado um dos diluidores mais conhecidos utilizados em ciprinídeos (Nahiduzzaman et al., 2012). Além disso, muitos autores também utilizam um diluidor descrito por Kurokura et al. (1984)

resultantes da combinação dos sais NaCl, KCl, CaCl₂ e NaHCO₃ (Akçay et al., 2004; Rani & Munuswamy, 2014). Outro tipo de diluidor utilizado em ciprinídeos é a glicose (Horváth et al., 2007). Esta age como substrato de energia, componente osmótico e agente crioprotetor em função do seu alto peso molecular, contribuindo para o equilíbrio osmótico e atuando como substituto de eletrólitos (Holt, 2000).

Em geral, os diluidores acrescidos de açúcares são capazes de melhorar a motilidade espermática durante a criopreservação seminal de algumas espécies de ciprinídeos (Urbányi et al., 2006). A combinação de sais (NaCl, KCl) e açúcares (frutose, glicose e sacarose) podem ser utilizados da mesma forma como diluidores de sêmen de carpa comum (Irawan et al., 2010).

Outra alternativa, é a utilização do diluidor água de coco em pó (ACP[®]), composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos. O ACP[®] é considerado uma das inovações mais recentes da biotecnologia do sêmen de peixe e já foi utilizado com sucesso por Linhares (2012) para a criopreservação seminal de carpa comum. Recentemente, Ögretmen et al. (2014) obtiveram resultados satisfatórios de motilidade espermática, taxas de fertilização e eclosão utilizando extrato bruto de própolis como diluidor para a criopreservação de sêmen de carpa comum, sendo identificado compostos fenólicos, terpenóides, flavonóides, ácidos graxos, açúcares e outros componentes.

Os diluentes seminais também atuam como carreadores de crioprotetores, agindo em conjunto para proteger os espermatozoides contra os efeitos deletérios da congelamento. Os crioprotetores podem ser classificados como internos ou externos. Os crioprotetores internos atuam na redução do ponto crioscópico da água intracelular evitando a formação de cristais de gelo e o comprometimento da integridade da membrana espermática interna durante as mudanças de temperatura. Os crioprotetores internos comumente utilizados em ciprinídeos são dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, propilenoglicol, dimetilacetamida (DMA), glicerol e etanol (Akçay et al., 2004; Irawan et al., 2010; Sultana et al., 2010). Na maioria dos estudos, o DMSO fornece os melhores resultados, provavelmente devido a sua rápida penetração em espermatozoides e sua interação com os fosfolipídios da membrana espermática (Suquet et al., 2000). Os crioprotetores externos atuam na estabilização da membrana plasmática e restauração dos fosfolipídeos perdidos pelos espermatozoides durante a congelamento. No entanto, estes não são utilizados frequentemente em ciprinídeos, sendo

relatadas na literatura à adição de gema de ovo-citrato ou somente gema de ovo as soluções diluidoras de sêmen de carpa comum (Sultana et al., 2010; Ögretmen et al., 2014).

Após a diluição, os crioprotetores requerem um tempo de equilíbrio para penetrar nas células. Este é um processo dinâmico e depende da permeabilidade dos espermatozoides, crioprotetores e as suas concentrações (Yang & Tiersch, 2009). Irawan et al. (2010) obtiveram uma taxa de motilidade espermática de $94,5 \pm 3,3\%$ utilizando como diluidor NaCl e sacarose, diluente DMSO 10% e tempo de equilíbrio de 10 min a 25 °C para a criopreservação seminal de carpa comum. Porém, utilizando as mesmas condições de criopreservação seminal da espécie, Linhares (2012) iniciou o processo de congelamento das amostras sem a utilização de tempo de equilíbrio obtendo $61,8 \pm 10,7\%$ de motilidade espermática. Por outro lado, Nahiduzzaman et al. (2012) observaram que quando as amostras de sêmen de carpa indiana (*Labeo calbasu*) foram criopreservadas com Alsever e DMSO 5%, maiores taxas de motilidade foram obtidos, aproximadamente $90 \pm 0\%$, em todos os tempos de equilíbrio (5, 10, 15, 20 e 25 min) testados a 4 °C. No entanto, Akçay et al. (2004) obteve uma taxa de motilidade espermática de 55% utilizando um tempo de equilíbrio de 45 min a 4 °C para criopreservar sêmen de carpa comum diluído em NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃ e DMSO 15%.

Portanto, a variedade dos tempos de equilíbrio relatadas na literatura é esperada devido a grande quantidade de diluidores utilizados para a família dos ciprinídeos. Além disso, a taxa de diluição é um fator a ser considerado.

TAXAS DE DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DO SÊMEN

As concentrações dos diluentes precisam ser ajustadas antes de serem misturados aos diluidores, pois os mesmos são tóxicos as células em temperatura ambiente. Comumente as concentrações dos crioprotetores são ajustados a 5 ou 10%, pois as pesquisas apontam que em altas concentrações alguns crioprotetores pode ser prejudicial à motilidade espermática. Rani & Munuswamy (2014) observaram menores taxas de viabilidade espermática (35%) utilizando 20% de DMSO, viabilidade mediana (61,5%, 62,3%, 60,8%) utilizando glicerol (10% e 20%) e DMSO 15% e viabilidade máxima (75,8%) utilizando 10% de DMSO em amostras de sêmen de carpa comum conservadas a 4 °C. Após a verificação da melhor concentração do crioprotetor e formação do diluente, o sêmen é submetido a diferentes taxas de diluição para se verificar a melhor proporção entre as quantidades de diluente e sêmen. A literatura

relata a utilização de diferentes taxas de diluição para a criopreservação do sêmen de carpa comuns tais como 1:1, 1:3, 1:5, 1:6, 1:7 e 1:9 (Linhart et al., 2000; Warnecke & Pluta, 2003; Sultana et al., 2010; Linhares, 2012).

Para o armazenamento em nitrogênio líquido a mistura (sêmen:diluente) deve ser envasada em recipientes padronizados para uniformizar o processo de resfriamento e evitar variações de transferência de calor. Para tal finalidade, podem ser utilizados palhetas de 0,25 mL, 0,5 mL, 1,2 mL, 2 mL e 5 mL (Linhart et al., 2000; Akçay et al., 2004; Horváth et al., 2007; Irawan et al., 2010). Em seguida, o sêmen é submetido a uma queda gradual de temperatura que influenciará o equilíbrio osmótico e o pH de soluções intra e extracelulares durante a congelação. O ideal é que a taxa de resfriamento seja rápida o suficiente para minimizar o tempo de exposição às soluções concentradas e lenta o suficiente para minimizar a quantidade de formação de gelo intracelular (Yang & Tiersch, 2009). Essa taxa de resfriamento varia de acordo com o equipamento utilizado para fazê-lo.

EQUIPAMENTOS DE CONGELAÇÃO

Os equipamentos utilizados para congelar as amostras de sêmen são as caixas térmicas de poliestireno, refrigeradores programáveis, *dry shippers* e botijões criogênicos. A caixa térmica de isopor é formada por poliestireno, dentro da qual é adaptada uma bandeja metálica distante do fundo alguns centímetros acima da superfície do nitrogênio líquido. As dimensões (comprimento x largura x altura) das caixas utilizadas podem variar de 27-40 cm x 18-24 cm x 28-33 cm (Lahnsteiner et al., 2000; Linhares, 2012). A altura ideal para a congelação de sêmen acima da superfície do nitrogênio líquido varia entre as espécies de ciprinídeos, sendo utilizadas 2, 3, 4 e 6 cm (Irawan et al., 2010; Linhares, 2012). A temperatura na caixa pode variar de -100 a -130 °C dependendo da quantidade de nitrogênio líquido despejado. As amostras são suspensas sob a bandeja e congeladas por um período específico em vapor de nitrogênio líquido podendo ser deixadas no interior da caixa por 3, 10, 20 ou 25 min (Alvarez et al., 2003; Urbányi et al., 2006; Boryshpolets et al., 2009; Irawan et al., 2010). Dependendo da espécie de peixe e da velocidade de resfriamento, o método de congelação de sêmen em caixa térmica de poliestireno pode ser tão eficaz quanto à utilização de um refrigerador programável.

Este último equipamento citado anteriormente é programado para controlar o resfriamento gradual de amostras biológicas antes de serem imersas em nitrogênio líquido. A redução da temperatura é

realizada durante um período determinado pelo programador estabelecendo-se um intervalo de temperatura inicial e final para o término do resfriamento. Este processo é chamado de curva de resfriamento e pode variar entre as taxas de resfriamento e intervalos de temperatura inicial e final. Nahiduzzaman et al. (2012), em apenas uma etapa, resfriou as amostras de 5°C a -80°C numa taxa de resfriamento de 10°C/min enquanto Irawan et al. (2010) utilizou a mesma taxa de resfriamento porém um intervalo de temperatura diferente de 25°C a -40°C. Sultana et al. (2010), utilizando duas etapas, primeiramente resfriou as amostras de 5°C a -4°C numa taxa de resfriamento de 4°C/min e em seguida prosseguiu o resfriamento de -4°C a -80°C sob uma taxa de 10°C/min. No entanto, Linhart et al. (2000) utilizou um protocolo diferente resfriando primeiramente as amostras de 4°C a -9°C numa taxa de resfriamento de 4°C/min e em seguida continuou de -11°C a -80°C sob uma taxa de 11°C/min.

O *dry shipper* é um contêiner para transportar com segurança amostras em temperaturas criogênicas. Trata-se de um botijão em alumínio, cujo interior está recoberto por um material de absorção de nitrogênio líquido responsável pela congelação a vapor de amostras de sêmen a uma taxa de resfriamento de aproximadamente 25–40 °C min⁻¹ com estabilização gradual de -181 °C em 3 min (Taitson et al., 2007). O equipamento foi utilizado com sucesso para carpa comum, obtendo boas taxas de motilidade espermática quando comparado à caixa de poliestireno comumente utilizada para a espécie (Linhares, 2012). No entanto, são escassas as pesquisas que relatam a utilização do *dry shipper* para criopreservar sêmen de carpa comum. O *dry shipper* é utilizado com frequência para as espécies nativas brasileiras tais como *Brycon insignis* e *Brycon opalinus* obtendo resultados positivos de motilidade, fertilização e eclosão (Viveiros et al., 2012a,b).

Após o equilíbrio térmico, o sêmen congelado é transferido para um botijão de nitrogênio líquido, onde pode ser conservado por longos períodos (Li et al., 2010) até ser utilizado para fertilização.

FERTILIZAÇÃO

O sucesso do protocolo de criopreservação é verificado através da descongelação do sêmen em banho de imersão térmica e avaliação da qualidade espermática, sendo a fertilização artificial a etapa final para a análise da qualidade dos gametas. A biotécnica pode ser realizada por dois métodos diferentes: o método úmido que se baseia na mistura de gametas masculinos e femininos coletados simultaneamente com água (Sultana et al., 2010) e o método a seco que mistura

primeiramente os gametas acrescentando-se água em seguida (Akçay et al., 2004).

A reprodução artificial em carpa é mais complexa porque o procedimento de inseminação requer uma solução específica para evitar a aderência entre os ovócitos que ocorre normalmente na água doce. A aderência é oriunda do envelope vitelino que reveste os ovócitos e é formado por carboidratos desidratados (Linhart et al., 1995). Essas camadas acelulares envoltórias servem para proteção, nutrição e barreira pela qual os espermatozoides devem atravessar (Montanari, 2013). Entretanto, essa mesma aderência é responsável pela formação de uma massa de ova que dificulta o encontro da micrópila pelos espermatozoides, prejudicando o processo de fertilização.

A solução comumente utilizada pode ser formulada de duas formas conforme a quantidade de ureia adicionada. Uma delas é composta por 3 g de ureia e a outra por 20 g de ureia juntamente com 4 g de NaCl para cada litro de água. Essas soluções atuam na ativação dos espermatozoides e remoção da adesividade dos ovócitos durante agitação contínua por 1 hora a 1 hora e 30 minutos. Após esse período adiciona-se uma solução de ácido tânico (0,5g/L) por 20 segundos, removendo-a em seguida (Billard et al., 1995). Vale ressaltar que muitos autores relatam a utilização da solução contendo 3% de ureia (Horváth et al., 2007; Irawan et al., 2010). No entanto, Billard et al. (1995) afirmam que a solução contendo 20% de ureia é uma solução melhorada, necessitando de menos tempo de agitação para a remoção da adesividade dos ovócitos. Além disso, pode-se utilizar também o leite em pó composto por 27,2% de gordura, 26,6g de albumina, 37,2g de açúcar do leite, 5,8g de íons, 0,2g de lecitina e 3g de água em 100g do mesmo para a preparação de uma solução de 40g de leite em pó por litro de água declorada ou limpa. A solução de leite em pó deve ser adicionada lentamente misturando-se um volume de 1 L da solução por Kg de ovócitos. Após 60 minutos, adiciona-se lentamente mais água durante 10 minutos para substituição da solução de leite e em seguida ovócitos podem ser transferidos para as incubadoras (Linhart et al., 2003).

Durante os testes de fertilização necessita-se definir a dose inseminante ideal, ou seja, a proporção mínima de espermatozoides por ovócito capaz de produzir a máxima sobrevivência em termos de larvas eclodidas. Esta técnica conserva e economiza gametas, melhora a utilização do macho e contribui para um aumento da variabilidade genética. O sucesso de uma fertilização artificial utilizando uma dose inseminante é determinado por meio da taxa de fertilização, ou seja, a partir de uma coleta aproximada de 150 embriões contam-se aqueles em estágio de gástrula e divide-se pelo número de

ovócitos fertilizados (Horváth et al., 2003). Da mesma forma, também é calculada a taxa de eclosão por meio da contagem do número de larvas eclodidas dividida pelo número total de ovócitos fertilizados. A definição da dose inseminante utilizando sêmen criopreservado de ciprinídeos já foi estabelecida por alguns autores obtendo diferentes resultados de taxa de fertilização e eclosão (Quadro 1).

Posteriormente, os ovócitos fertilizados são transferidos para um sistema de incubação, desenvolvido de acordo com as especificidades do animal. As incubadoras podem apresentar dimensões de 0,6m de altura e 0,7m de diâmetro com capacidade para 90L (Nahiduzzaman et al., 2012). É importante ressaltar que o suprimento de oxigênio, temperatura adequada e fluxo contínuo de água são fundamentais para o desenvolvimento embrionário regular. Este é comumente descrito pelos autores em fases divididas em zigoto, primeiras clivagens, mórula, blástula, gástrula, fechamento do blastóporo, diferenciação do embrião e embrião eclodido, sendo o tipo de clivagem meroblástica discoidal. Durante o

surgimento de cada fase é registrado o tempo (horas ou minutos) após o início da fertilização.

Sividanés et al. (2012) observou as primeiras segmentações com 22 minutos, estágio de mórula com 1 hora e 43 minutos, blástula com 2 horas e 27 minutos, gástrula com 5 horas e 50 minutos, fechamento do blastóporo com 9 horas e 49 minutos, diferenciação do embrião com 12 horas e 56 minutos e a eclosão das larvas com 20 horas e 3 minutos após a fertilização a uma temperatura de 24 °C. Enquanto Nica et al. (2012) verificou as primeiras segmentações com 50 minutos, estágio de mórula e blástula com 50 minutos a 1 hora e 35 minutos, gástrula com 6 horas e 15 minutos, diferenciação do embrião com 15 horas e eclosão das larvas com 50 horas após a fertilização a uma temperatura de 22 °C. Portanto percebe-se que os tempos dos registros embrionários dependem principalmente da temperatura da água de incubação dos embriões. Do exposto, torna-se fundamental o conhecimento da embriologia detalhada da carpa comum para uma melhor compreensão da biologia da espécie.

Quadro 1. Taxas de fertilização e eclosão (%) após a realização de fertilização artificial utilizando diferentes doses inseminantes com sêmen descongelado de algumas espécies de ciprinídeos.

Espécies	Meios de congelamento		Dose inseminante (sptsz:ovócito)	Taxa de fertilização (%)	Taxa de eclosão (%)	Referências
	Diluidor	Diluyente				
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Glicose	Metanol 10%	2,6-3,4x10 ⁴ :1	74 ± 15	67 ± 17	Horváth et al. (2003)
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Kurokura + própolis	Dimetilsulfóxido 10% + gema de ovo 10%	1,0 x10 ⁵ :1	95,0 ± 0,6	60,3 ± 2,0	Öğretmen et al. (2014)
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Kurokura + trealose	Dimetilacetamida 20%	1,0 x10 ⁵ :1	98	80±2	Warnecke & Pluta (2003)
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	NaCl + Sacarose	DMSO 10%	2,0x10 ⁵ :1	73,6±6,5	62,8±5,9	Irawan et al. (2010)
Carpa espelho (<i>Cyprinus carpio</i>)	NaCl + KCl + Tris	Dimetilacetamida 15%	2,5x10 ⁵ :1	25,9	-	Akçay et al. (2004)
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Kurokura	DMSO 10%	1,8-2,4x10 ⁵ :1	56±10	52±9	Linhart et al. (2000)
Carpa indiana (<i>Labeo calbasu</i>)	Alsever	DMSO 10% ou Metanol 10%	4,1x10 ⁵ :1	65±3 ou 63±4	45±2 ou 45±3	Nahiduzzaman et al. (2012)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biotécnicas utilizadas na produção de carpa comum vêm avançando e contribuindo para aprimorar programas de reprodução de ciprinídeos. No entanto, diante de uma variedade de ferramentas empregadas na produção de alevinos não há uma padronização nos protocolos de criopreservação e reprodução assistida. A literatura relata diferenças entre diluidores, taxas de diluição, armazenamento do sêmen, equipamentos de congelamento e técnicas de fertilização assistida em um mesmo grupo de animais, tornando esse conjunto de biotécnicas inconsistentes e de difícil difusão. Portanto, percebe-se que os protocolos são desenvolvidos para alcançar determinados objetivos conforme as necessidades e condições de pesquisa de cada grupo.

Neste contexto, é fundamental o aperfeiçoamento continuado destas biotécnicas, permitindo futuramente a preservação de espécies em via de extinção bem como aquelas de potencial produtivo capazes de favorecer a geração de proteínas de origem animal adequadas para aniquilar a fome proteica que assola parte da população mundial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez B., Fuentes R., Pimentel R., Abad Z., Cabrera E., Pimentel E. & Arenal A. 2003. High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. *Aquaculture*. 220:195–201.
- Akçay E., Bozkurt Y., Seçer S. & Tekün N. 2004. Cryopreservation of Mirror Carp Semen. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*. 28:837-843.
- Billard R., Cosson J., Perchec G. & Linhart O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*. 129:95-112.
- Blaxter J.H.S. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*. 172:1189-90.
- Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Li P., Hulak M., Gela D. & Linhart O. 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology*. 59:291–296.
- Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. Relatório 2008. Capturado em 8 de out. 2012. *Online*. Disponível na Internet http://www.dnocs.gov.br/php/CGU/dnocs_relatorio_anual_2008.pdf
- Holt W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53:47-58.
- Horváth A., Miskolczi E. & Urbányi B. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*. 16:457–460.
- Horváth A., Miskolczi E., Mihálffy S., Osz K., Szabo K. & Urbányi B. 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*. 54:251–257.
- Irawan H., Vuthiphandchai V. & Nimrat S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal reproduction science*. 122:236-243
- Kurokura H., Hirano R., Tomita M. & Iwahashi M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*. 37:267-273.
- Lahnsteiner F., Berger B., Horváth A., Urbányi B. & Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*. 54:1477-1496.
- Linhars F.R.A. 2012. Efeito de diferentes taxas de diluição e protocolos de congelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum (*Cyprinus carpio*) criopreservados em água de coco em pó (ACP-104). *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 80p.
- Linhart O., Kudob S., Billard R., Slechtad V. & Mikodina E.V. 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture*. 129:75-93.
- Linhart O., Rodina M. & Cosson J. 2000. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. *Cryobiology*. 41:241-250.
- Linhart O., Rodina M., Gela D., Kocour M. & Rodriguez M. 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness. *Aquatic Living Resources*. 16:450–456.
- Li P., Hulak M., Koubek P., Sulc M., Dzyuba B., Boryshpolets S., Rodina M., Gela D., Manaskova-Postlerova P., Peknicova J. & Linhart O. 2010. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Theriogenology*. 74(3):413-23.
- Montanari T. 2013. Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas [recurso eletrônico]. 1ª ed. Ed. do autor, Porto Alegre. Capturado em 10 de out. 2013. *Online*. Disponível na Internet <http://www.ufrgs.br/livrodeembrio/>
- Nahiduzzamana M., Hassanb M., Roya P.K., Hossain A., Hossaina M.A.R. & Tiersch T.R. 2012. Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. *Animal Reproduction Science*. 136:133–138.
- Nica A., Cristea V., Gheorghe D., Hoha G.V. & Enache I.B. 2012. Embryonic and larval development of japanese ornamental carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*. 58:116-120.
- Öğretmen F., İnanan B.E. & Öztürk M. 2014. Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Cryobiology*. 68:107–112.
- Rani K.U. & Munuswamy N. 2014. Preliminary studies on the cryopreservation of spermatozoa in the fresh water fish common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(3):181-186.
- Salmito-Vanderley C.S.B., Vieira M.J.A.F., Leite L.V., Oliveira F.C.E., Linhares F.R.A., Salgueiro C.C.M. & Nunes J.F. 2012. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*. 22(1):255-268.

- Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(4):370-384.
- Sividanes V.P., Dutra F.M. & Mendonça P.P. 2012. Desenvolvimento embrionário da carpa prateada, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 19(1):21-25.
- Sultana M., Nahiduzzaman M., Hassan M.M., Khanam M.U.H. & Hossain M.A.R. 2010. Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *University journal of zoology*. 28:51-55.
- Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J. & Billard R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*. 31(3):231-243.
- Taitson P.F., Chami E. & Godinho H.P. 2007. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. *Animal reproduction science*. 105(3-4):283-291.
- Tiersch T.R., Yang H., Jenkins J.A. & Dong Q. 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 65:93-508.
- Urbányi B., Szabó T., Miskolczi E., Mihálffy S., Vranovics K. & Horváth Á. 2006. Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *Journal of Applied Ichthyology*. 22:201-204.
- Viveiros A.T.M., Isaú Z.A., Caneppele D. & Leal M.C. 2012a. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology*. 78:803-810.
- Viveiros A.T.M., Orfão L.H., Nascimento A.F., Corrêa F.M. & Caneppele D. 2012b. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*. 78:361-368.
- Warnecke D. & Pluta H. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture*. 215:167-185.
- Yang H. & Tiersch T. R. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka and xiphophorus. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*. 149(2):224-232.