

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**CRIOCONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE ROBALO-PEVA**  
*Centropomus parallelus* (POEY, 1860)

**Rodrigo Massao Tiba**

**Orientador: Dra. Idili da Rocha Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Junho – 2007**

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**CRIOCONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE ROBALO-PEVA**  
*Centropomus parallelus* (POEY, 1860)

**Rodrigo Massao Tiba**

**Orientador: Dra. Idili da Rocha Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Junho – 2007**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus melhores e

insubstituíveis amigos, meus pais,

Tadayoshi e Lúcia Tiba, com muito amor,

simplicidade, humildade e disciplina me criaram.

Sempre lutando e garantindo à minha melhor criação e

formação profissional e juntos, concretizamos mais uma

etapa da minha vida.

Sei que sempre estarão ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Dra. Idili da Rocha Oliveira, pela oportunidade de sua orientação e ao pesquisador Pedro Carlos da Silva Serralheiro, onde juntos, sempre dedicaram, apoiaram, ensinaram e por tudo que aprendi.

Ao programa de pós-graduação do Instituto de Pesca pelo acolhimento e oportunidade de obter mais um título na minha formação.

Às professoras e pesquisadoras Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva e Dra. Elizabeth Romagosa, pela minha qualificação e pela amizade que caminha.

Aos professores Dr. Newton Castagnolli e Dra. Elizabeth Romagosa, pelo meu título de mestre, amizade e finalização de mais uma etapa percorrida.

Ao grande amigo e pesquisador do Instituto de Zootecnia Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva, pelos conhecimentos e colaboração nas análises estatísticas, pela nossa velha amizade expresso meus agradecimentos.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação do Instituto de Pesca, pelos conhecimentos adquiridos pelas disciplinas assistidas.

À amiga e pesquisadora do Centro de Aqüicultura (CAUNESP) Dra. Fabiana Pilarski, pela ajuda, apoio e estadia em Jaboticabal.

Aos amigos, que graças a Deus, são muitos e independentes de trabalharem com peixes ou não, não citarei seus nomes, sempre estarão ao meu lado e poderei contar com vocês. Expresso meus eternos agradecimentos.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Crioconservação do sêmen	2
1.2 A espécie <i>Centropomus parallelus</i>	6
1.3 Objetivos	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Reprodutores de robalo-peva <i>C. parallelus</i>	9
2.2 Coleta do sêmen	9
2.3 Avaliação das características do sêmen fresco	10
2.3.1 Volume de sêmen	10
2.3.2 Densidade espermática	12
2.3.3 Motilidade e tempo de motilidade espermáticas	13
2.4 Crioconservação do sêmen	13
2.4.1 Experimento I – Determinação dos diluentes	14
2.4.2 Experimento II – Determinação da velocidade de congelamento	15
2.4.3 Experimento III – Determinação da proporção sêmen:diluyente	16
2.4.4 Experimento IV – Determinação da concentração do crioprotetor	16
2.4.5 Experimento V – Determinação do tempo de equilíbrio	16
2.4.6 Experimento VI – Determinação da capacidade de fecundação do sêmen	17
2.5 Análise dos dados	19
3. RESULTADOS	21

3.1	Características do sêmen fresco	21
3.2	Crioconservação do sêmen	21
3.2.1	Experimento I – Determinação do diluente	21
3.2.2	Experimento II – Determinação da velocidade de congelamento	22
3.2.3	Experimento III – Determinação da proporção sêmen:diluente	23
3.2.4	Experimento IV – Determinação da concentração do crioprotetor	24
3.2.5	Experimento V – Determinação do tempo de equilíbrio	25
3.2.6	Experimento VI – Determinação da capacidade de fecundação do sêmen	27
4.	DISCUSSÃO	30
4.1	Determinação das características do sêmen fresco	30
4.1.1	Volume do sêmen	30
4.1.2	Densidade espermática	31
4.1.3	Motilidade e tempo de motilidade espermáticas	32
4.2	Crioconservação do sêmen	34
4.2.1	Experimento I - Determinação do diluente	34
4.2.2	Experimento II - Determinação da velocidade de congelamento	37
4.2.3	Experimento III - Determinação da proporção sêmen:diluente	38
4.2.4	Experimento IV - Determinação da concentração do crioprotetor	39
4.2.5	Experimento V - Determinação do tempo de equilíbrio	41
4.2.6	Experimento VI – Determinação da capacidade de fecundação do sêmen	42
5.	CONCLUSÕES	44
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

## ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representação esquemática das análises do sêmen fresco e dos experimentos de crioconservação com o sêmen do robalo-peva <i>C. parallelus</i>	11
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática do experimento de capacidade de fecundação com sêmen fresco e crioconservado de <i>C. parallelus</i>	18
<b>Tabela 1.</b>	Dados de comprimento total (mm), peso total (g), volume de sêmen (mL), densidade de espermatozoides (célx $\text{mL}^{-1}$ ), motilidade (%) e tempo de motilidade espermáticas (s) dos reprodutores de <i>C. parallelus</i>	21
<b>Tabela 2.</b>	Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de <i>C. parallelus</i> , obtidos no experimento I	22
<b>Tabela 3.</b>	Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%) obtidos no experimento I	22
<b>Tabela 4.</b>	Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de <i>C. parallelus</i> , obtidos no experimento II	23
<b>Tabela 5.</b>	Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%) obtidos no experimento II	23
<b>Tabela 6.</b>	Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de <i>C. parallelus</i> , obtidos no experimento III	24
<b>Tabela 7.</b>	Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de <i>C. parallelus</i> , obtidos no experimento IV	25
<b>Tabela 8.</b>	Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%), obtidos no experimento IV	25
<b>Tabela 9.</b>	Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de <i>C. parallelus</i> , obtidos no experimento V	26

<b>Tabela 10.</b>	Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%), obtidos no experimento V	27
<b>Figura 3.</b>	Capacidade de fecundação do sêmen fresco e crioconservado de <i>C. parallelus</i>	27
<b>Tabela 11.</b>	Médias e desvios padrão da capacidade de fecundação (%) do sêmen fresco e do crioconservado, em relação à proporção espermatozóide:ovócito, obtidos no experimento VI	28
<b>Tabela 12.</b>	Médias, desvios padrão e valores mínimos e máximos da capacidade de fecundação (%), obtidos no experimento VI	29

## RESUMO

Com a finalidade de desenvolver um protocolo de crioconservação para o sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus* foram analisados os efeitos de soluções diluentes (pH 6,1, 7,8 e 8,2), velocidades de congelamento (3, 15, 30, 45, 60 e 90°Cx $\text{min}^{-1}$ ), proporções sêmen:diluyente (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 v/v), concentrações do crioprotetor dimetilsulfóxido (0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 17,5%) e tempos de equilíbrio (30, 60, 120, 240, 480, 960, 1.920 e 3.840 segundos) sobre a motilidade e tempo de motilidade espermáticas e a capacidade de fecundação do sêmen congelado. O sêmen usado para os testes de congelamento foi colhido de machos adultos, provenientes de reprodução artificial, com idade de 2 anos e em primeira maturação gonadal (peso e comprimento total, respectivamente, de 699,0±70,42g e 317,0±41,93 mm) criados em tanques-rede no ambiente marinho. Para cada análise foi usada mistura de sêmen de 10 indivíduos. O sêmen foi coletado para a determinação do volume individual colhido, motilidade e tempo de motilidade espermáticas, densidade de espermatozóides e capacidade de fecundação do sêmen fresco. No congelamento, 5 palhetas plásticas (repetições) contendo o material correspondente a cada tratamento foram depositadas, individualmente, em container de vapor de nitrogênio (-196°C). Vinte e quatro horas após o congelamento, cada palheta foi submersa em água (27°C) durante 1 minuto, para determinação da motilidade e tempo de motilidade espermáticas. A capacidade de fecundação do sêmen congelado e fresco foi determinada calculando-se volumes de sêmen para obtenção das concentrações 1,0x10<sup>4</sup>, 2,0x10<sup>4</sup>, 4,0x10<sup>4</sup>, 6,0x10<sup>4</sup>, 8,0x10<sup>4</sup>, 1,0x10<sup>5</sup>, 1,2x10<sup>5</sup>, 1,4x10<sup>5</sup>, 1,6x10<sup>5</sup>, 1,8x10<sup>5</sup>, 2,0x10<sup>5</sup>, 2,2x10<sup>5</sup> espermatozóides:ovócito. Para desova, as fêmeas receberam 1UI/g/peso de gonadotrofina coriônica humana (hCG). No sêmen crioconservado, as maiores taxas da motilidade (74,0±5,47%) e do tempo de motilidade espermáticas (738,6±6,80s) foram obtidas com o diluyente pH 8,2, DMSO 10%, proporção sêmen:diluyente 1:3, velocidade de congelamento 90°Cx $\text{min}^{-1}$  e tempo de equilíbrio 60 seg. Comparando com o sêmen fresco (motilidade de 100% e tempo de motilidade de 464,6±47,56s), a motilidade do sêmen descongelado foi recuperada em aproximadamente 74% dos espermatozóides, enquanto que o tempo de motilidade foi aproximadamente 60% superior. Em relação à fecundação, as maiores taxas alcançadas com o sêmen congelado (ao redor de 99%) foram obtidas a partir da concentração de 160.000 espermatozóides:ovócito, significativamente diferente (p<0,01) do sêmen fresco. A quantidade de espermas, portanto, foi 14,28% superior à necessária para se obter o mesmo sucesso com o sêmen fresco. Taxas de fecundação semelhantes (p<0,01) foram obtidas a partir da concentração 1,6x10<sup>5</sup> espermatozóides:ovócito, indicando que o protocolo de crioconservação utilizado constitui importante recurso na preservação das características funcionais dos espermatozóides e no controle da reprodução do robalo-peva *C. parallelus*.

## ABSTRACT

Aiming to develop cryopreservation methods of the semen of fat snook, *Centropomus parallelus* had been analyzed the effect of diluents solutions (pH 6.1, 7.8 and 8.2), cooling rate (3, 15, 30, 45, 60 and 90°Cx $\text{min}^{-1}$ ), proportions of semen:diluent (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 and 1:5 v/v), concentrations of the dimetil sulfoxid crioprotetor (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 and 17.5%) and the equilibration time (30, 60, 120, 240, 480, 960, 1,920 and 3,840 seconds) on the motility and motility time and the semen fertilization capacity of the frozen semen. The semen used for the freezing tests was harvested of males, two years old, proceeding from artificial reproduction, at their first gonadal maturation. Fish body weight and length, respectively, of 699.0  $\pm$  70.42g and 317.0  $\pm$  41.93mm raised in cages that were set in oceanic environment. For each analysis it was used semen mixture of 10 individuals. Semen was collected for the determination of the harvested individual volume, motility and motility time, density of spermatozoa and fertilization capacity of the fresh semen. From each sample 5 plastic vanes (repetitions) corresponding material for each treatment had been deposited, individually, in nitrogen vapor container (-196°C). Twenty and four hours after the freezing, each vane was submerged in water (27°C) during 1 minute, for determination of the motility rate and motility time. The fertilization capacity of the frozen and fresh semen was determined calculating volumes of semen for attainment of the concentrations 1.0x10<sup>4</sup>, 2.0x10<sup>4</sup>, 4.0x10<sup>4</sup>, 6.0x10<sup>4</sup>, 8.0x10<sup>4</sup>, 1.0x10<sup>5</sup>, 1.2x10<sup>5</sup>, 1.4x10<sup>5</sup>, 1.6x10<sup>5</sup>, 1.8x10<sup>5</sup>, 2.0x10<sup>5</sup>, 2.2x10<sup>5</sup> sperm:egg. For spawning, the females had received 1 UI/g/weight from human corionic gonadotrofin being (hCG). In the cryopreserved semen, the highest motility rate (74.0  $\pm$  5.47%) and the motility time (738.6  $\pm$  6.80 second) had been gotten with diluent pH 8.2, DMSO 10%, 1:3semen:diluent ratio, cooling rate 90 °C $\text{xmin}^{-1}$  and equilibration time of 60 second. Comparing with the fresh semen (100% motility and motility time of 464.6  $\pm$  47.56 second), the motility of the defrosted semen was ream in approximately 74% of the spermatozoa, whilst the motility time was approximately 60% superior. In relation to the fertilization rate, the highest taxes reached with the frozen semen (around 99%) had been obtained with the concentration of 160,000 sperm:egg, with significant differences (p<0,01) of the cool semen. The amount of sperm, therefore, was 14.28% superior of the necessary armament of fresh semen one to get success with the. Similar taxes of fertilization (p<0,01) had been gotten from the concentration 1.6x10<sup>5</sup> sperm:egg, indicating that the protocol of used cryopreservation constitutes important resource in the preservation of the functional characteristics of the spermatozoa and in the control of the reproduction of fat snook *C. parallelus*.

## 1. INTRODUÇÃO

Face ao drástico declínio dos estoques naturais de peixes no mundo (NEW, 1997) e das estimativas de que a pesca comercial levará, nas próximas décadas, ao esgotamento irreversível dos principais estoques de peixes marinhos de interesse comercial, cenário agravado pela paulatina perda da estabilidade dos ecossistemas que os sustentam (WORM *et al.*, 2006), torna-se imprescindível o desenvolvimento dos métodos de conservação dos gametas e sua aplicação no controle da reprodução das espécies (DONALDSON *et al.*, 2000).

Desde que BLAXTER (1953) utilizou espermatozóides conservados a  $-79^{\circ}\text{C}$ , no cruzamento de duas populações com períodos diferentes de desovas do arenque do Atlântico (*Clupea harengus*), as técnicas de congelamento têm sido utilizadas no controle da reprodução assistida de muitas espécies de interesse econômico (BILLARD *et al.*, 1995), na formação de bancos de sêmen de espécies ameaçadas (HARVEY, 1996) e na manutenção da variabilidade genética nas pisciculturas (MC ANDREW *et al.*, 1993). Segundo CLOUD *et al.* (1990) e TIERSCH (2000), a tecnologia tem potencial para ser aplicada, também, na criação e distribuição de organismos geneticamente modificados, com importantes impactos para a piscicultura moderna. Análises sobre o impacto econômico da introdução do sêmen congelado no ciclo de produção comercial de algumas espécies (enguia européia *Anguilla anguilla*, peixe gato *Ictalurus punctatus* e, principalmente, salmão do Atlântico *Salmo salar*) indicam o crescimento da indústria de sêmen, também, para outras espécies (CAFFEY e TIERCH, 2000).

Estima-se que, das mais de 200 espécies com protocolos de crioconservação experimentalmente determinados (THIRUMALA *et al.*, 2006), aproximadamente 40 são do ambiente marinho (GWO, 2000). Muitos desses estudos foram detalhadamente revisados em várias publicações (MOUNIB, 1978; SCOTT e BAYNES, 1980; RANA, 1996; TIERSCH, 2000; SUQUET *et al.*, 2000; GWO, 2000; CHAO e LIAO, 2001; THIERSCH, 2001; BILLARD *et al.*, 2004). Em espécies marinhas do litoral brasileiro, a técnica foi aplicada,

primeiro, na tainha *Mugil platanus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1992) e, depois, no robalo-peva *Centropomus parallelus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1998) e linguado *Paralichthys orbignyanus* (LANES *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2006; CAVALCANTI *et al.*, 2006).

### **1.1 Crioconservação do sêmen**

O sêmen dos peixes é composto de células (espermatozóides) suspensas em meio fluído (plasma seminal). Os espermatozóides são constituídos por uma membrana semipermeável que abriga em seu interior quantidades distintas de água, organelas, sais dissolvidos, açúcares, proteínas e lipídeos (CIERESZKO *et al.*, 2000). No modelo estrutural mais aceito para a membrana espermática, sub-unidades de fosfolipídeos estão ligadas a proteínas formando um mosaico (MC ANDREW *et al.*, 1993). Em temperaturas fisiológicas, as cadeias de ácidos graxos (bipolares em relação à água) estão arranjadas em duas superfícies, formando uma parede, com as porções hidrofílicas dirigidas para as bordas em contato com as soluções aquosas internas e externas das células e as hidrófobas direcionadas para o centro da membrana. O plasma seminal, que na maioria dos teleósteos é secretado nos testículos e dutos espermáticos, contém água e substâncias minerais (predominando os íons sódio, potássio e cloro) e orgânicas (lipídios, açúcares, proteínas e esteróides) que refletem tanto a atividade metabólica como a reprodutiva dos espermatozóides. Alguns componentes do plasma, no entanto, são originados de deteriorações de espermatozóides e células dos testículos e dutos espermáticos. Em temperaturas fisiológicas, a natureza da estrutura lipoprotéica da membrana celular dos espermatozóides tem papel importante na regulação do influxo e efluxo da água e dos íons em solução, mantendo semelhantes as concentrações dos solutos dos meios intra e extracelulares (DENNISTON *et al.*, 2000; THIRUMALA *et al.*, 2006).

Enquanto o sêmen é mantido nos testículos, os espermatozóides geralmente se mantêm viáveis durante todo período reprodutivo da espécie, ao contrário do que se verifica no sêmen extraído. Neste caso, a atividade metabólica dos espermatozóides altera a estabilidade do fluído seminal,

reduzindo o tempo de viabilidade (LAHNSTEINER, 2000). Alterações no regime metabólico dos espermatozóides *ex situ*, através de técnicas de resfriamento, vêm sendo introduzidas no sentido de ampliar a sua viabilidade.

Em peixes, a redução térmica do sêmen dos patamares fisiológicos para temperaturas próximas do 0°C, diferentemente dos mamíferos, não afeta a estabilidade dos espermatozóides (MANN e LUTWAK-MANN, 1955; STOSS, 1983). Na crioconservação, porém, as temperaturas criogênicas, usualmente inferiores a -150°C, ocasionam danos significativos e irreversíveis aos espermatozóides (MAZUR, 1964).

O nitrogênio líquido (-196°C), introduzido juntamente com o oxigênio e argônio, no final da década de 1950, para o congelamento do sêmen de bovinos (CHANDLER, 2000), é atualmente o sistema refrigerante mais amplamente aplicado na crioconservação do sêmen de mamíferos e de peixes (MC ANDREW *et al.*, 1993).

A conseqüência direta da redução da temperatura dos espermatozóides é a diminuição dos movimentos moleculares e, por extensão, da atividade metabólica, o que explica o prolongamento da longevidade *in vitro*. O tempo de sobrevivência, porém, está relacionado com a intensidade do resfriamento. Ao zero absoluto (-273,16 °C), temperatura do hélio líquido, os movimentos moleculares cessam, paralisando todos os eventos biológicos e bioquímicos (TAYLOR, 1987). Nessa temperatura, as células podem ser preservadas geneticamente estáveis por período extremamente longo, sendo afetadas somente pela radiação de fundo (ASHWOOD-SMITH, 1980). Na prática, porém, nenhum evento biológico importante ocorre em material biológico estocado em temperaturas iguais ou inferiores a -150 °C (MAZUR, 1964).

A crioconservação de células e tecidos animais envolve uma série de eventos físico-químicos, semelhantes aos descritos para os sistemas eutéticos (FRANKS, 1982), relacionados com a dinâmica do transporte do calor e da água entre células e tecidos e o meio circundante (BART, 2000).

Um dos aspectos da crioconservação refere-se às mudanças do ponto de congelamento da água do fluido extracelular e o seu efeito nas propriedades osmóticas dos espermatozóides, à medida que a temperatura declina. Com a água misturada a diferentes tipos de solutos (compostos minerais e orgânicos), o seu ponto de congelamento ocorrerá em patamares abaixo do 0°C, ponto de fusão da água pura. (MC ANDREW *et al.*, 1993; DENNISTON *et al.*, 2000).

Com o sêmen sendo continuamente resfriado, a água do meio extracelular começa a se solidificar antes da intracelular. A nucleação e o acúmulo do gelo no meio extracelular irão resultar no aumento da concentração do soluto residual que se torna hiperosmótico em relação as células super resfriadas. Nesse momento, a água do interior dos espermatozóides, que ainda permanece no estado líquido, começa a fluir para diminuir a elevada pressão externa (MAZUR, 1970).

Na seqüência, o calor latente de cristalização é dissipado do sêmen fazendo com que a temperatura de congelamento do meio se eleve, mantendo-se, porém, em patamares negativos. Porém, com o declínio das temperaturas de refrigeração, mais água é subtraída do meio extracelular sob a forma de gelo, resultando em queda contínua do ponto de congelamento do sêmen e aumento gradativo da osmolalidade do soluto residual, em relação aos espermatozóides. A compensação é feita mediante o contínuo afluxo da água residual super resfriada do interior dos espermatozóides, até que o solvente e soluto residuais se solidifiquem completamente no ponto eutético.

A amplitude dos efeitos subseqüentes da variação contínua da osmolalidade dos meios intra e extracelular sobre os espermatozóides super resfriados, dependem da velocidade de resfriamento aplicada ao sêmen (VIVEIROS, 2002). Se o resfriamento for suficientemente lento, a célula é capaz de perder água rapidamente, sofrer desidratação e redução do tamanho. A permanência muito prolongada dos espermatozóides nessas condições de concentração crescente do soluto, já que parte da água efluída é continuamente convertida em gelo, acentua seu grau de desidratação e encolhimento e, eleva os níveis de concentração dos meios intra e

extracelulares. Os efeitos desses eventos, denominados “efeitos de solução” (MAZUR, 1970) inviabilizam os espermatozóides. Por outro lado, se a velocidade de congelamento aplicada for muito rápida, as células não irão dispor do tempo suficiente para eliminar a quantidade de água necessária para recompor o equilíbrio eletroquímico entre os solutos. Aqui, os efeitos de uma excessiva exposição dos espermatozóides predisporá a formação de pequenos cristais de gelo no seu interior (MAZUR, 1977). Ao descongelar o sêmen, esses cristais coalescem (recristalização) em blocos maiores de gelo causando perfurações irreversíveis (crioinjúrias) nas estruturas celulares (FRANKS, 1982). A magnitude da recristalização pode ser minimizada aplicando-se ao sêmen elevadas velocidades de descongelamento.

As principais injúrias físicas e químicas causadas aos espermatozóides pela variação da concentração de solutos, desidratação, modificações na estrutura da membrana celular, alterações do pH, recristalização do gelo no interior e fora dos espermatozóides, durante o processo de resfriamento e aquecimento, podem ser minimizadas aplicando-se ao sêmen um tratamento adequado. Tipos e proporções de diluentes e de crioprotetores, tempos de equilíbrio, velocidades de congelamento e de descongelamento são investigados em peixes para otimizar os resultados da crioconservação.

Para LUBZENS *et al.* (1997), os maiores benefícios resultantes da preservação de gametas de peixes são: a) aumentar a eficiência de programas de melhoramento genético de estoques de reprodutores, obtidos através de métodos clássicos de seleção ou por manipulação genética (triplóides, transgenia); b) permitir a fecundação cruzada entre espécies que se reproduzem em estações de reprodução distintas; c) estender a estação de reprodução; d) aumentar a proteção dos estoques de peixes contra doenças, pela introdução de linhagens resistentes a doenças; e) disponibilizar continuamente gametas com qualidade determinada; f) diminuir os custos das pisciculturas referentes a manutenção dos plantéis de reprodutores; g) proteger os estoques criados contra perda acidental de linhagens geneticamente melhoradas.

## 1.2 A espécie *Centropomus parallelus*

A família Centropomidae é representada, unicamente, pelo gênero *Centropomus*, que compreende os robalos encontrados no ocidente e oriente das Américas, nos Oceanos Pacífico e Atlântico (RIVAS, 1962).

No Brasil, FIGUEIREDO e MENEZES (1980) citam para o sudeste e sul do Brasil, a ocorrência de quatro espécies, *C. parallelus* (Poey, 1860) e *C. undecimalis* (Bloch, 1792) distribuindo-se do sul da Flórida (USA) ao sul de Santa Catarina (BR), e *C. ensiferus* e *C. pectinatus*, da Flórida ao Rio de Janeiro (BR). Embora constituam grupos com semelhanças morfológicas bem acentuadas possuem, no entanto, características discriminantes que possibilitam sua identificação. As espécies do gênero *Centropomus* são estenotérmicas e estão restritas às regiões tropicais e subtropicais das Américas (RIVAS, 1962), sendo encontradas na região costeira, geralmente, em águas em torno de 24°C (SHAFLAND e FOOTE, 1983; RIVAS, 1986). Caracterizam-se, também, por serem eurihalinas, estando presentes em águas marinhas, continentais e, principalmente, em águas salobras de ambientes estuarinos (CHÁVES, 1961; PÉREZ-PINZON, 1991).

O robalo é considerado um dos recursos pesqueiros mais importantes, do ponto de vista social, para as populações humanas tradicionais do litoral do país. A exploração desse recurso, inicialmente equilibrada e sustentável, exercida principalmente como fonte de subsistência, através da pesca, passou a ser cada vez mais intensiva em decorrência da demanda do mercado e da pesca recreativa. Em estados nordestinos, porém, existe uma produção tradicional de *C. undecimalis*, baseada no recrutamento de indivíduos jovens para engorda em viveiros estuarinos naturais, cujo volume não é contabilizado nas estatísticas pesqueiras (SILVA, 1976; MAIA *et al.*, 1980; ROCHA e OKADA, 1980).

Sobre *C. parallelus*, com o sucesso das pesquisas sobre reprodução artificial e produção de larvas em escala-piloto já consolidadas (ALVAREZ-LAJONCHÉRE, 2001; CERQUEIRA, 1995, 2002; FERRAZ *et al.*, 2003;

GODINHO *et al.*, 1997, 2000; MIOSO, 1995, SERRALHEIRO *et al.*, 2004 a e b), a exploração da espécie em escala comercial é atrativa, contando com possibilidades reais de êxito.

Outros estudos com *C. parallelus*, realizados nos últimos anos, contribuíram para esses resultados, como aqueles sobre aspectos reprodutivos da espécie, definindo a época e o tipo de desova, curva de maturação gonadal, estádios gonadais e relações morfofisiológicas (GODINHO *et al.*, 1996, 1997; SOUZA, 1998; SERRALHEIRO *et al.*, 1998; FERRAZ *et al.*, 2004; RODRIGUES, 2005); sobre incubação de ovos (ARAÚJO e CERQUEIRA, 2005); sobre manejo e nutrição de jovens (CERQUEIRA e BRÜGGER, 2001; SEIFFERT *et al.*, 2001; TEMPLE *et al.*, 2004; ALVES JR. *et al.*, 2006; da SILVA ROCHA *et al.*, 2005; LEMOS *et al.*, 2006) e sobre o desempenho no crescimento de jovens até a fase adulta (CAVALHEIRO, 2000; ALVAREZ-LAJONCHÉRE, 2001; BARROSO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Porém, em relação a crioconservação de sêmen na família Centropomidae, não existem informações na literatura referentes a animais criados no cativeiro. Os únicos dados existentes foram os obtidos com o robalo-flexa *C. undecimalis* (GRIER e NEIDING, 2000; TIERSCH *et al.*, 2004) e com o robalo-peva *C. parallelus* (SERRALHEIRO *et al.* 1998, 2003, 2004 a e b), capturados no ambiente natural.

### **1.3 OBJETIVOS**

Como objetivo geral este trabalho teve a finalidade de desenvolver um protocolo de crioconservação do sêmen de reprodutores de robalo-peva *C. parallelus* criados em cativeiro, para utilização no controle da reprodução.

Especificamente, buscou-se:

- a) avaliar os parâmetros volume de sêmen coletado, densidade espermática, motilidade, tempo de motilidade e capacidade de fecundação do sêmen

fresco de reprodutores em primeira maturação gonadal, criados em tanques-rede;

- b) examinar os efeitos do congelamento na motilidade e tempo de motilidade espermáticas e, também, na capacidade de fecundação do sêmen quando são empregados diferentes tipos de diluentes, velocidades de congelamento, proporções sêmen:diluyente, concentrações de crioprotetor e tempos de equilíbrio.
- c) determinar a capacidade de fecundação do sêmen crioconservado em comparação ao fresco.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reprodutores de robalo-peva *C. parallelus***

Os reprodutores de *C. parallelus* utilizados nos experimentos foram oriundos de reprodução induzida e larvicultura conduzidas, em fevereiro de 2002, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul do Instituto de Pesca (SAA), em Cananéia (SP). Aos 3 meses de idade, os jovens foram transportados para o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte, em Ubatuba (SP), em tanques (10m<sup>3</sup>) conectados a um sistema de recirculação de água marinha, durante 180 dias, e depois em tanques-rede (2,0x2,0x1,5 m) instalados 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, as 9:00 e 17:00 horas.

Em fevereiro de 2004, período reprodutivo do robalo-peva, os exemplares, com 2 anos de idade e em primeira maturação gonadal, foram avaliados para determinação do grau de maturação. Os machos maduros, selecionados pela presença de sêmen na papila genital, após leve compressão abdominal, foram transferidos para tanques de plástico cilíndricos (volume de 10m<sup>3</sup>) conectados em sistema de recirculação de água marinha e aclimados durante 5 dias. A temperatura e salinidade foram mantidas constantes, respectivamente, 26°C e 35.

### **2.2 Coleta do sêmen**

Antes da coleta do sêmen, os dados de comprimento total e peso de cada reprodutor foram anotados. Tanto para a análise das características do sêmen fresco como, também, para a realização de cada experimento de crioconservação e de capacidade de fecundação foi utilizado sêmen de 10 exemplares, escolhidos, aleatoriamente, a partir do lote de 80 reprodutores maduros, previamente selecionados.

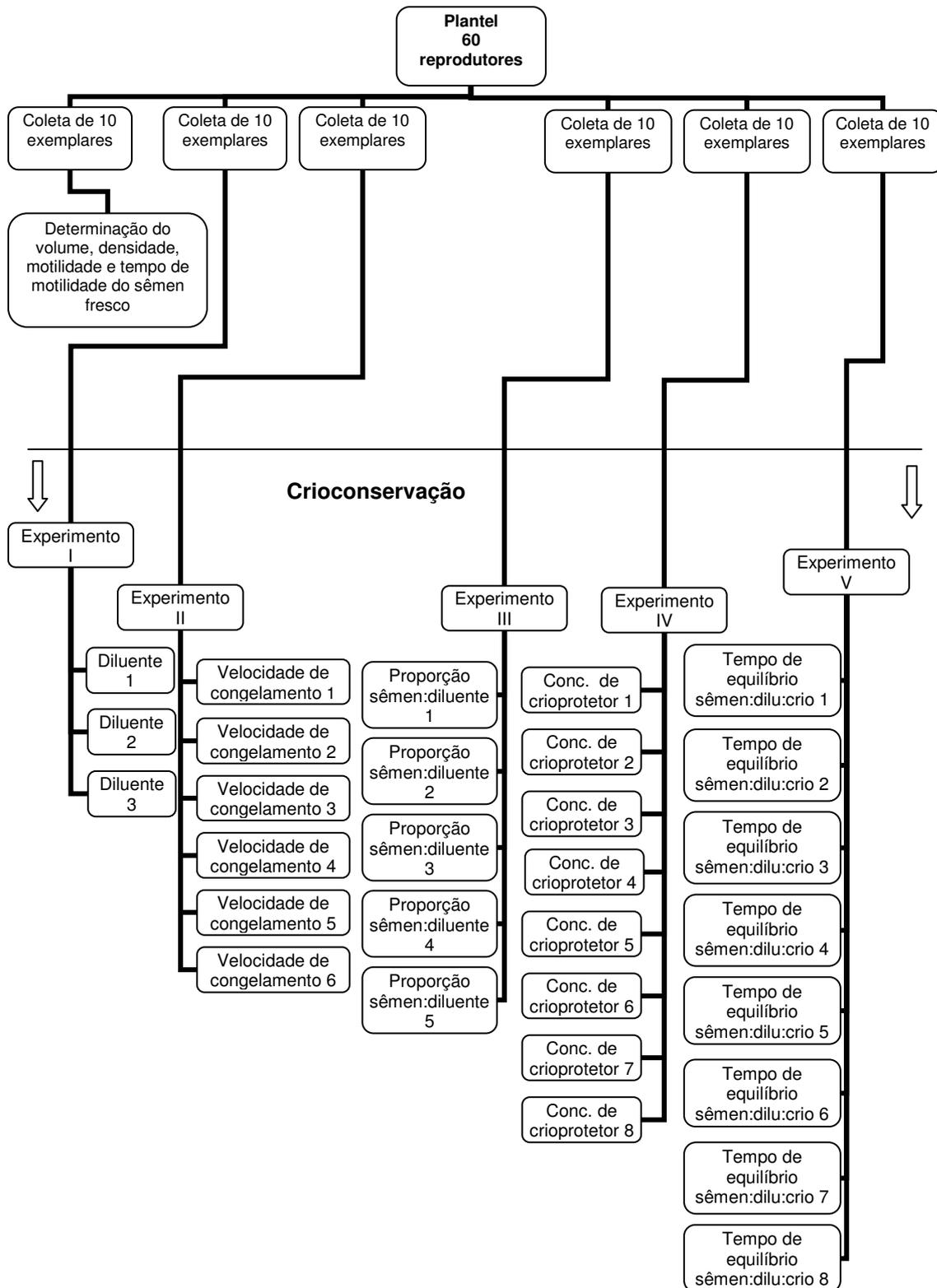
## **2.3 Avaliação das características do sêmen fresco**

### **2.3.1 Volume do sêmen**

O sêmen de cada reprodutor foi colhido, individualmente, em seringas plásticas de 1mL graduadas envoltas em papel opaco, pressionando manualmente a região abdominal compreendida entre as nadadeiras peitoral e caudal, no sentido crânio-caudal.

Durante a colheita do sêmen, evitou-se a contaminação com fezes e, principalmente, urina, uma das principais fontes de redução da qualidade do sêmen (RANA, 1995) e, também, a incidência de luz. Depois de aferido o volume do sêmen das seringas, o conteúdo foi transferido para um único recipiente de plástico opaco graduado de 5mL, mantido em ambiente com temperatura constante de 26°C.

As análises de avaliação do sêmen e os experimentos de crioconservação realizados com o robalo-peva estão esquematizados na Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática das análises do sêmen fresco e dos experimentos de crioconservação com o sêmen do robalo-peva *C. parallelus*.

### 2.3.2 Densidade espermática

A concentração espermática foi estimada após a diluição do sêmen, em duas etapas, até atingir a diluição final de 1:10<sup>4</sup>. Primeiro, alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada a 990 µL de solução de formol salino (5 %). No momento da realização da contagem, os espermatozóides foram novamente diluídos utilizando a mesma solução e mesmo fator de diluição. A contagem foi feita em câmara de Neubauer Improved, em microscópio óptico de contraste de fase (200 x).

O número de espermatozóides foi estimado segundo a fórmula:

$$Ce = N \times Fc;$$

onde:

**Ce**: concentração de espermatozóides por mm<sup>3</sup>;

**N**: número de células contadas na câmara de Neubauer;

**Fc**: fator de correção, onde:

$$Fc = (q \times fd)/d;$$

em que:

**q** = 5, razão entre o número total de quadrados da câmara de Neubauer (25) e o número de quadrados em que foram realizadas as contagens (5);

**fd** = 10<sup>4</sup>, representa o fator de diluição da alíquota de sêmen;

**d** = 0,1 mm, representa a profundidade da câmara de Neubauer.

A média da densidade espermática foi utilizada como referência para análise da capacidade de fecundação do sêmen (Experimento VI).

### **2.3.3 Motilidade e tempo de motilidade espermáticas**

A motilidade espermática foi estimada logo após o término da colheita do sêmen de cada indivíduo. Alíquota de 15  $\mu\text{L}$  de sêmen fresco foi depositada em lâmina de vidro e, a seguir, misturada com igual volume de água marinha (35, 26°C). A homogeneização foi feita com auxílio de lamínula que, em seguida, foi depositada sobre a amostra do sêmen. Na estimação da motilidade, em microscópio óptico com contraste de fase (400x), foram considerados os espermatozóides que apresentaram movimento em único campo focal, escolhido aleatoriamente, com a intensidade da luz mantida inalterada. A taxa de motilidade do sêmen foi estimada pelo número de espermatozóides móveis/número total de espermatozóides presentes no campo óptico.

A duração da motilidade dos espermatozóides foi cronometrada desde o início da homogeneização do sêmen com água marinha até que todas células se tornassem imóveis. O tempo de motilidade celular foi aferido na mesma amostra do sêmen preparada para observar a motilidade espermática.

### **2.4 Crioconservação do sêmen**

Devido ao fato dos reprodutores de robalo-peva, em primeira maturação gonadal, liberarem, por indivíduo, volume de sêmen insuficiente para suprir o exigido, os fatores do congelamento examinados neste estudo (tipo de diluente, proporção sêmen:diluente, concentração do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO), velocidade de congelamento e tempo de equilíbrio) foram analisados em experimentos separados e na ordem, como mostra a Figura 1. O critério de misturar o sêmen de um número fixo de 10 indivíduos foi adotado, neste estudo, para completar o volume requerido para cada teste. A agilização das colheitas e análises microscópicas do sêmen e o envolvimento das seringas e frascos com material opaco, evitaram que o tempo despendido na coleta e as condições de armazenamento do sêmen *in vitro* interferissem na estabilidade dos espermatozóides.

Por experimento, a seguir, foi utilizado sêmen de 10 reprodutores. Para cada tratamento foram congeladas 5 palhetas plásticas seladas com álcool polivinílico (repetições). O congelamento foi realizado em botijão criogênico de vapor de nitrogênio (-196°C), seguindo as etapas enumeradas por WAYMAN e TIERSCH (2000). Vinte e quatro horas após o congelamento, as palhetas foram descongeladas em água a 27°C, durante 2 minutos, para aferição das características motilidade (%) e tempo de motilidade espermáticas (segundos).

O melhor resultado obtido em cada experimento, em termos de motilidade e tempo de motilidade espermáticas, foi utilizado para definir as combinações do sêmen para o exame dos fatores subseqüentes, conforme Figura 1. Somente sêmen com motilidade espermática superior a 90% foi utilizado para o desenvolvimento dos experimentos de congelamento.

#### **2.4.1 Experimento I – Determinação do diluente**

Três soluções com diferentes composições iônicas e pH, baseadas na composição química do plasma seminal de teleósteos marinhos, foram propostas como soluções diluidoras do sêmen. Diluente 1 (com pH 6,1): NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; MgCl<sub>2</sub>, 0,4266 g/L (CHAO *et al.*, 1975); Diluente 2 (com pH 7,8): NaCl, 6,5; KCl, 3,0; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g/L (PELETEIRO *et al.*, 1996); Diluente 3 (com pH 8,2): NaCl, 7,89; KCl, 1,19; CaCl<sub>2</sub>, 0,22; MgCl<sub>2</sub>, 0,72531; NaPO<sub>4</sub>, 0,0805; NaHCO<sub>3</sub>, 0,84 g/L (SERRALHEIRO *et al.*, 1992; 1999).

O sêmen colhido dos exemplares, após a mistura, foi dividido em volumes iguais, em três frascos plásticos opacos, para o teste respectivo de cada um dos diluentes. Os diluentes, previamente, acrescido do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10%, foram adicionados lentamente ao sêmen até completar a proporção de 1:1 (v/v).

O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos e a velocidade de congelamento, 90°Cxmin<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2 Experimento II – Determinação da velocidade de congelamento**

Para definir a velocidade de congelamento mais adequada à preservação das características espermáticas do sêmen do robalo-peva, foram testadas as seguintes velocidades: 3, 15, 30, 45, 60 e 90°Cx $\text{min}^{-1}$ . O monitoramento da velocidade foi feito com auxílio de um par-termoelétrico, com variação de temperatura entre 100 e -300°C.

No sistema criogênico empregado, as velocidades de congelamento são determinadas, previamente, para cada espécie em função do tamanho das palhetas utilizadas para o envasamento do sêmen (WAYMAN e TIERSCH, 2000).

As palhetas foram confeccionadas a partir de tubos de plástico criogênico, utilizados rotineiramente na inseminação artificial de bovinos. Os tubos foram cortados em tamanhos variados para que, uma vez preenchidos com diferentes volumes de sêmen diluído do robalo-peva, durante o resfriamento no botijão criogênico, pudessem refletir as velocidades de congelamento examinadas neste estudo. Cada palheta foi selada em uma das extremidades, com álcool polivinílico em pó interposto entre camadas de algodão hidrófilo e hidrófobo.

Para este experimento, o sêmen foi diluído com a solução previamente definida no Experimento I.

A proporção de sêmen:diluyente foi de 1:1, a concentração do crioprotetor (DMSO), 10% e o tempo de equilíbrio, 60 segundos.

#### **2.4.3 Experimento III – Determinação da proporção sêmen:diluyente**

Para otimizar a proporção sêmen:diluyente na crioconservação do sêmen do robalo-peva, foram examinadas as proporções de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 (v/v).

Para o congelamento do sêmen, neste experimento, o tipo de diluente e a velocidade de congelamento foram selecionados levando-se em consideração os melhores resultados de motilidade e tempo de motilidade espermáticas obtidos, respectivamente, no Experimento I e Experimento II. A concentração do crioprotetor DMSO foi de 10% e o tempo de equilíbrio, 60 segundos.

#### **2.4.4 Experimento IV – Determinação da concentração do crioprotetor**

A determinação do grau de proteção e/ou de toxicidade conferido pelo dimetilsulfóxido (DMSO) aos espermatozóides do robalo-peva durante o processo de congelamento, foi realizada através da adição do crioprotetor ao diluente nas seguintes concentrações: 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5%. O tipo do diluente, a velocidade de congelamento e a proporção sêmen:diluente utilizados, neste experimento, foram determinados nos experimentos anteriores. O tempo de equilíbrio foi fixado em 60 segundos.

#### **2.4.5 Experimento V – Determinação do tempo de equilíbrio**

Neste experimento, foram examinados os tempos de 30; 60; 120; 240; 480; 960; 1.920 e 3.840 segundos. O sêmen diluído permaneceu estocado em um único frasco de plástico opaco, em temperatura ambiente de 26°C, até que o período máximo estipulado para o equilíbrio do sêmen com o diluente (3.840 segundos) fosse atingido. Ao transcorrer o tempo relativo a cada período de equilíbrio, as palhetas respectivas foram preenchidas com parte do material estocado e em seguida depositadas no botijão criogênico. Esse procedimento foi repetido até que o período máximo de absorção do crioprotetor pelos espermatozóides fosse atingido.

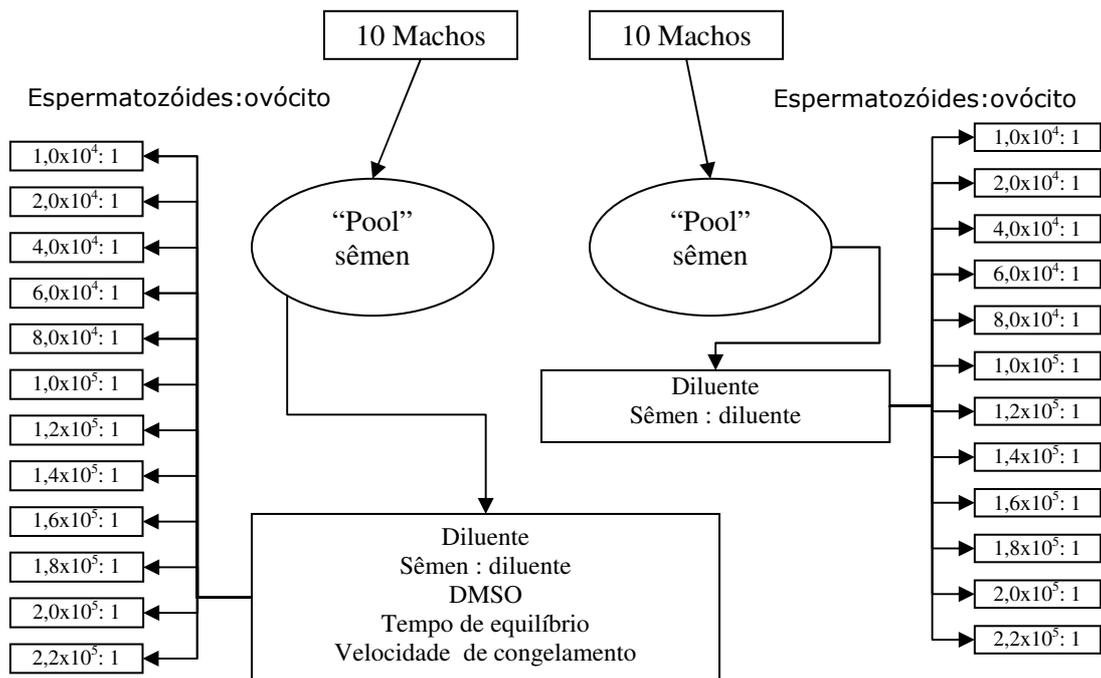
#### **2.4.6 Experimento VI – Determinação da capacidade de fecundação do sêmen**

O teste de capacidade de fecundação do sêmen crioconservado do robalo-peva foi realizado simultaneamente com o do sêmen fresco,

inseminando-se ovócitos oriundos de uma única fêmea. Tanto para o sêmen fresco como para o crioconservado foram utilizados o mesmo diluente e mesma diluição do sêmen.

No total, foram injetadas 10 fêmeas e os critérios utilizados para a seleção, indução hormonal e análises dos ovócitos foram os mesmos descritos por GODINHO *et al.* (2000). A biometria e observação de 500 ovócitos foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (300x), com ocular micrométrica. Em amostras de ovócitos transparentizados em solução de Serra (LEMANOVA e SAKUN, 1975) foram observadas, também, a posição da vesícula e a distribuição das gotas de óleo intracitoplasmáticas. No momento da desova, aproximadamente 35 horas após a indução, os ovócitos procedentes das fêmeas que responderam ao tratamento foram recolhidos, individualmente, por leve pressão abdominal direto em bandejas plásticas. Para a inseminação foram utilizados os ovócitos das fêmeas que apresentarem diâmetro médio ao redor de 600 $\mu$ m, distribuição de frequência unimodal, com vesícula germinativa rompida e presença de uma única gota de óleo.

Em seguida, 120 lotes de ovócitos (parcelas), contendo aproximadamente 1.000 ovócitos/lote, foram distribuídos em recipientes plásticos de 50mL para a inseminação, simultânea, de 60 lotes com sêmen fresco e 60 com crioconservado. Na inseminação, com ambos os semens, foram utilizados volumes diferentes calculados com auxílio de microsseringas, levando-se em consideração a média da concentração espermática observada no sêmen fresco, correspondendo às concentrações de espermatozóides: ovócitos determinadas para este experimento (Figura 2). 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.



**Figura 2.** Representação esquemática do experimento de capacidade de fecundação com sêmen fresco e crioconservado de *C. parallelus*

O material correspondente a cada lote foi, posteriormente, depositado em incubadoras individuais com volume de 1L, mantidas dentro de um tanque com circulação intermitente de água marinha (35) e temperatura de 28°C. Dezesete 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.

## 2.5 Análise dos dados

Os valores obtidos nos experimentos de crioconservação do sêmen são estimativas da motilidade (porcentagem) e do tempo da motilidade espermáticas (segundos).

Para avaliação da capacidade de fecundação foi determinada a porcentagem do total dos ovos embrionados em relação ao total dos ovos inseminados, e a porcentagem dos ovos embrionados com o sêmen fresco e com o crioconservado.

Para análise estatística dos dados, utilizou-se o SAS (Statistical Analyses System), o SAS/STAT, versão 6.11 de 1990. As médias das diferentes variáveis foram estimadas pelo procedimento Means. A análise de variância foi efetuada pelo procedimento ANOVA (Analysis of Variance). Este procedimento realiza teste de igualdade entre três ou mais médias, permitindo verificar se a variabilidade dentro dos grupos é maior que a existente entre os grupos. A técnica supõe independência e normalidade das observações e igualdade entre as variâncias dos grupos. A significância das diferenças obtidas entre os tratamentos em cada experimento, em termos de motilidade (%) e tempo de motilidade (s) e, também, entre as taxas de fecundação observadas com os dois semens e entre as diferentes concentrações de espermatozoides:ovócito foram obtidos pelo método ANOVA, usando procedimentos paramétricos, com base no teste de variação múltipla de Tukey. Os valores de  $p < 0,01$  foram considerados significantes.

Para os valores de porcentagem, no caso da motilidade e taxa de fecundação, foi aplicado o teste de normalidade, que segundo SAMPAIO (1998), certifica que os valores não ultrapassem o limite inferior (zero) e/ou superior (100%) da variável, em porcentagem, garantindo uma distribuição normal (simétrica) de valores no intervalo permitido de 0 a 100%.

No caso da variável analisada ultrapassar os limites permitidos, foi realizada a transformação angular dos dados através da fórmula:

$$\text{variável transformada} = \arcsen\sqrt{x}$$

em que:

**x** precisa ser expresso em percentual/100, ou seja,  $x \leq 1$ .

Para as variáveis que não apresentavam normalidade, o procedimento ANOVA foi realizado com a variável transformada pela fórmula descrita acima. No entanto, os valores apresentados nas diferentes tabelas e gráficos para as variáveis transformadas, estão na escala original, ou seja, sem transformação.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Características do sêmen fresco

Os dados obtidos da biometria dos exemplares e das características do sêmen fresco (volume, densidade espermática, motilidade e tempo de motilidade espermática) estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados de comprimento total (mm), peso total (g), volume de sêmen (mL), densidade de espermatozoides (cél $\times$ mL $^{-1}$ ), motilidade (%) e tempo de motilidade espermáticas (s) dos reprodutores de *C. parallelus*

Macho n°	Comprimento Total (mm)	Peso Total (g)	Características Espermáticas			
			Volume Sêmen (mL)	Densidade (x10 <sup>10</sup> cél $\times$ mL <sup>-1</sup> )	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
1	268,0	600,0	1,9	2,5	100	480,0
2	259,0	590,0	2,0	2,7	100	455,0
3	285,0	700,0	1,8	2,5	100	398,0
4	362,0	750,0	2,4	2,0	100	523,0
5	355,0	750,0	2,1	2,7	100	511,0
6	339,0	740,0	0,8	2,9	100	478,0
7	270,0	610,0	2,3	2,0	100	378,0
8	325,0	740,0	2,1	2,3	100	461,0
9	345,0	745,0	2,3	2,4	100	511,0
10	362,0	765,0	0,9	2,6	100	451,0
Média	317,0	699,0	1,9	2,5	100	464,6
Dp	± 41,93	±70,42	± 0,56	± 0,30	± 0,00	± 47,56

#### 3.2 Crioconservação do sêmen

##### 3.2.1 Experimento I – Determinação do diluente

Os resultados deste experimento indicaram que o diluente 3, com pH 8,2, resultou em melhor tempo de motilidade espermática, com diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) quando comparado aos diluentes 1 e 2, respectivamente, com pH 6,1 e 7,8. Em relação a motilidade dos

espermatozoides, os resultados obtidos com os três diluentes não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de *C. parallelus*, obtidos no experimento I

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

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

<sup>A-C</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

O teste de normalidade foi aplicado nesses dados, não havendo necessidade de transformação (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%) obtidos no experimento I

Observação	Média	Dp	% Mínima	% Máxima
Motilidade	69,9	0,19	69,5	70,3

### 3.2.2 Experimento II – Determinação da velocidade de congelamento

Os resultados deste experimento indicaram que as velocidades de congelamento  $90^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $60^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  apresentaram os melhores desempenhos, de acordo com os valores da motilidade e tempo de motilidade espermáticas, sem diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre elas (Tabela 4).

Os valores da motilidade e do tempo de motilidade espermáticas foram inversamente proporcionais ao volume das palhetas.

**Tabela 4.** Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de *C. parallelus*, obtidos no experimento II

Volume (ml)	Velocidade (°Cxmin <sup>-1</sup> )	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
0,25	90	76,0 ± 5,47 <sup>a</sup>	739,6 ± 7,98 <sup>A</sup>
0,50	60	76,0 ± 4,18 <sup>a</sup>	741,8 ± 12,02 <sup>A</sup>
0,75	45	57,0 ± 4,47 <sup>b</sup>	537,0 ± 10,53 <sup>B</sup>
1,00	30	36,0 ± 5,47 <sup>c</sup>	462,0 ± 24,09 <sup>C</sup>
1,25	15	17,0 ± 4,47 <sup>d</sup>	184,4 ± 11,26 <sup>D</sup>
1,50	3	5,0 ± 0,00 <sup>e</sup>	64,8 ± 11,96 <sup>E</sup>

<sup>a-e</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,01)

<sup>A-E</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,01)

O teste de normalidade foi aplicado nesses dados e os valores de porcentagens foram transformados (Tabela 5). Analisando os valores transformados, verificou-se que não houve mudança nos resultados anteriormente apresentados.

**Tabela 5.** Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%) obtidos no experimento II

Observação	Média	Dp	% Mínima	% Máxima
Motilidade	44,5	30,09	-14,5	103,5

### 3.2.3 Experimento III – 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 6).

**Tabela 6.** Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de *C. parallelus*, obtidos no experimento III

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

<sup>a</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

<sup>A</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

Neste experimento, não foi preciso aplicar o teste de normalidade, porque a média e o desvio padrão foram iguais e dentro dos limites para transformação angular.

#### **3.2.4 Experimento IV – Determinação da concentração do crioprotetor**

A concentração de crioprotetor (DMSO) de 10% apresentou melhor desempenho na crioconservação de sêmen, em termos de motilidade (%) e tempo de motilidade (s) espermáticas, com diferenças significativas ( $p < 0,01$ ), em relação às outras concentrações (Tabela 7).

**Tabela 7.** Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de *C. parallelus*, obtidos no experimento IV

DMSO (%)	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
0,0	5,0 ± 0,00 <sup>e</sup>	134,8 ± 8,40 <sup>G</sup>
2,5	15,0 ± 3,53 <sup>d</sup>	334,4 ± 8,53 <sup>E</sup>
5,0	40,0 ± 3,53 <sup>c</sup>	372,0 ± 17,66 <sup>D</sup>
7,5	60,0 ± 7,07 <sup>b</sup>	536,2 ± 9,49 <sup>B</sup>
10,0	84,0 ± 5,47 <sup>a</sup>	733,6 ± 12,54 <sup>A</sup>
12,5	60,0 ± 0,00 <sup>b</sup>	477,6 ± 18,51 <sup>C</sup>
15,0	19,0 ± 2,23 <sup>d</sup>	238,8 ± 17,46 <sup>F</sup>
17,5	7,0 ± 2,73 <sup>e</sup>	54,4 ± 6,65 <sup>H</sup>

<sup>a-e</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

<sup>A-H</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

Aplicando-se o teste de normalidade nestes dados houve a necessidade de transformação dos valores das porcentagens da motilidade (Tabela 8). Analisando os valores transformados verificou-se que não houve mudança em relação aos resultados anteriormente apresentados.

**Tabela 8.** Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%), obtidos no experimento IV

Observação	Média	Dp	% Mínima	% Máxima
Motilidade	36,25	29,28	-21,15	93,65

### 3.2.5 Experimento V – Determinação do tempo de equilíbrio

Os resultados indicam três melhores desempenhos na crioconservação dos tempos de equilíbrios de 30, 60 e 120 segundos, não havendo entre eles diferenças significativas ( $p < 0,01$ ). O tempo de equilíbrio de 60 segundos foi indicado para o experimento seguinte.

Os valores da motilidade e tempo de motilidade espermáticas têm correlação significativa ( $p < 0,01$ ) com os tempos de equilíbrio de 30 a 120 segundos, mas a partir de 240 segundos são inversamente proporcionais (Tabela 9).

**Tabela 9.** Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (s) do sêmen crioconservado de *C. parallelus*, obtidos no experimento V

Tempo de equilíbrio (s)	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
30	74,0 ± 4,18 <sup>a</sup>	735,6 ± 6,50 <sup>A</sup>
60	74,0 ± 5,47 <sup>a</sup>	738,6 ± 6,80 <sup>A</sup>
120	74,0 ± 4,18 <sup>a</sup>	736,2 ± 11,60 <sup>A</sup>
240	58,0 ± 2,73 <sup>b</sup>	537,0 ± 10,53 <sup>B</sup>
480	43,0 ± 4,47 <sup>c</sup>	477,6 ± 18,51 <sup>C</sup>
960	42,0 ± 5,70 <sup>c</sup>	372,0 ± 17,66 <sup>D</sup>
1.920	21,0 ± 6,51 <sup>d</sup>	134,8 ± 17,97 <sup>E</sup>
3.840	5,0 ± 0,00 <sup>e</sup>	28,4 ± 2,30 <sup>F</sup>

<sup>a-e</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

<sup>A-F</sup> Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas ( $p < 0,01$ )

Aplicando-se o teste de normalidade, neste experimento, foi necessária a transformação dos valores das porcentagens da motilidade (Tabela 10). Analisando os valores transformados, verificou-se que não houve mudanças nos resultados anteriormente apresentados.

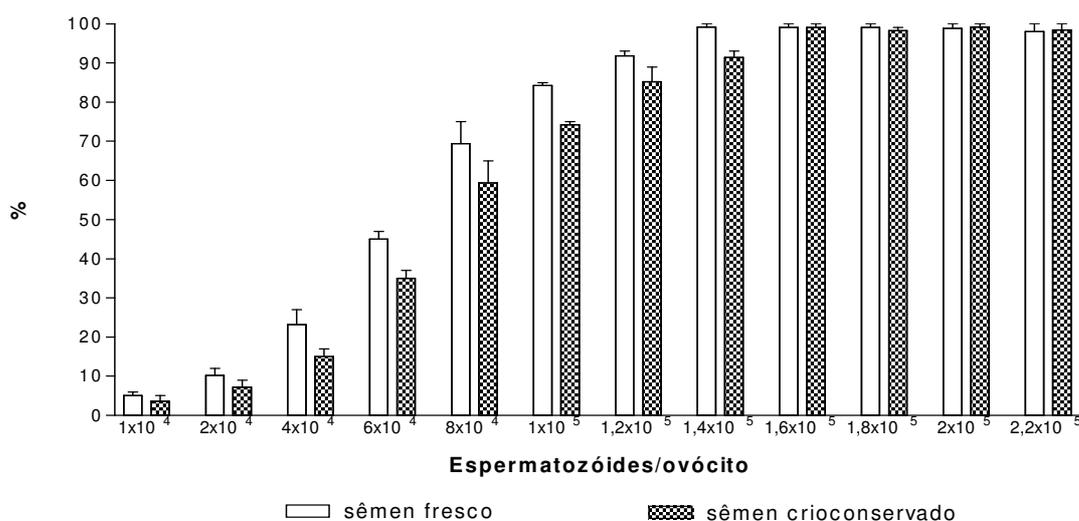
**Tabela 10.** Média, desvio padrão e valor mínimo e máximo da motilidade (%), obtidos no experimento V

Observação	Média	Dp	% Mínima	% Máxima
Motilidade	48,9	26,08	-2,2	99,9

### 3.2.6 Experimento VI – Determinação da capacidade de fecundação do sêmen

Com base nos resultados dos experimentos anteriores foram empregadas as seguintes condições de criopreservação: diluente 3 (com pH 8,2); velocidade de congelamento  $90^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; proporção sêmen:diluente 1:3; concentração do DMSO 10%; tempo de equilíbrio 60 segundos.

Verificando as médias das porcentagens da capacidade de fecundação obtidas, observou-se que o sêmen criopreservado e o fresco atingiram o máximo da capacidade de fecundação (99%) e igualam seus desempenhos, sem diferença significativa ( $p < 0,01$ ), a partir da proporção de  $1,6 \times 10^5:1$  espermatozoides:ovócito. As proporções de  $1 \times 10^4:1$  a  $1,4 \times 10^5:1$  foram diferentes significativamente ( $p < 0,01$ ) entre elas (Tabela 11 e Figura 3).



**Figura 3.** Capacidade de fecundação do sêmen fresco e criopreservado de *C. parallelus*

**Tabela 11.** Médias e desvios padrão da capacidade de fecundação (%) do sêmen fresco e do crioconservado, em relação à proporção espermatozoides:ovócito, obtidos no experimento VI

Espermatozoides:ovócito	Sêmen fresco	Sêmen crioconservado
1,0x10 <sup>4</sup> :1	5,0 ± 0,71 <sup>A i</sup>	3,6 ± 1,14 <sup>B i</sup>
2,0x10 <sup>4</sup> :1	10,2 ± 1,30 <sup>A h</sup>	7,2 ± 1,48 <sup>B h</sup>
4,0x10 <sup>4</sup> :1	23,2 ± 2,77 <sup>A g</sup>	15,0 ± 1,58 <sup>B g</sup>
6,0x10 <sup>4</sup> :1	45,0 ± 2,35 <sup>A f</sup>	35,0 ± 2,35 <sup>B f</sup>
8,0x10 <sup>4</sup> :1	69,4 ± 3,65 <sup>A e</sup>	59,4 ± 3,65 <sup>B e</sup>
1,0x10 <sup>5</sup> :1	84,2 ± 0,84 <sup>A d</sup>	74,2 ± 0,84 <sup>B d</sup>
1,2x10 <sup>5</sup> :1	91,8 ± 1,10 <sup>A c</sup>	85,2 ± 2,86 <sup>B c</sup>
1,4x10 <sup>5</sup> :1	99,2 ± 0,84 <sup>A b</sup>	91,4 ± 1,34 <sup>B b</sup>
1,6x10 <sup>5</sup> :1	99,0 ± 0,71 <sup>A a</sup>	99,0 ± 0,71 <sup>A a</sup>
1,8x10 <sup>5</sup> :1	99,0 ± 1,00 <sup>A a</sup>	98,2 ± 0,84 <sup>A a</sup>
2,0x10 <sup>5</sup> :1	98,8 ± 1,30 <sup>A a</sup>	99,2 ± 0,84 <sup>A a</sup>
2,2x10 <sup>5</sup> :1	98,0 ± 2,12 <sup>A a</sup>	98,4 ± 1,14 <sup>A a</sup>

<sup>a - i</sup> Média e desvio com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,01).

<sup>A - B</sup> Média e desvio padrão com diferentes sobrescrito na mesma linha apresentam diferenças significativas (p<0,01).

Aplicando-se o teste de normalidade, neste experimento, também foi necessária a transformação dos valores das porcentagens da capacidade de fecundação (Tabela 12).

Analisando-se os valores transformados, verificou-se que não houve mudança em relação aos resultados anteriormente apresentados.

**Tabela 12.** Média, desvio padrão e valores mínimos e máximos da capacidade de fecundação (%), obtidos no experimento VI

Observação	Média	Dp	% Mínima	% Máxima
Sêmen fresco	68,6	37,44	- 4,8	141,9
Sêmen crioconservado	63,8	38,44	-11,5	139,2

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1 Determinação das características do sêmen fresco**

Em peixes, o volume, a densidade dos espermatozóides, a qualidade da motilidade espermática e a capacidade de fecundação do sêmen fresco têm sido comumente examinados, isoladamente ou no conjunto, como subsídios ao desenvolvimento dos protocolos de crioconservação do sêmen (STOSS, 1983; RANA, 1996; BILLARD *et al.*, 1996; HONEYFIELD e KRISE, 2000; SANSONE *et al.*, 2002; MILIORINI, 2006). Essas características, no entanto, estão sujeitas a amplas variações intraespecíficas atribuídas, principalmente, à variabilidade genética e idade intratesticular dos espermatozóides (SCOTT e BAYNES, 1980; BILLARD *et al.*, 1977); à sazonalidade do ciclo reprodutivo (MC ANDREWS *et al.*, 1993); à composição iônica e orgânica intracelular e do plasma seminal (CIERESZKO *et al.*, 2000; ALAVI e COSSON, 2006).

Essas fontes de variação da qualidade do sêmen fresco criam enormes dificuldades para definição de protocolos de congelamento específicos. O fato de, neste trabalho, usarmos reprodutores provenientes de reprodução induzida e em primeira maturação gonadal, mantidos sob o mesmo manejo alimentar, propiciou que as principais fontes de variação das características seminais se mantivessem sob controle. Mas, somente o exame conjunto da motilidade e a capacidade de fecundação do sêmen *in natura* determinou com mais eficácia os efeitos do congelamento sobre a preservação da viabilidade espermática no robalo-peva.

#### **4.1.1 Volume do sêmen**

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. Apesar de BILLARD *et al.* (1996) terem sugerido o peso das gônadas para estimar a produção, sua aplicação neste trabalho, implicaria na morte dos reprodutores, com impactos indesejados ao plantel. Por outro lado, em peixes que apresentam desovas múltiplas durante o período reprodutivo, a exemplo

do robalo-peva, a correlação da produção espermática com o peso das gônadas não refletiria o volume do sêmen produzido.

No procedimento de colheita, a pressão manual do abdome exercida para estimular a liberação do sêmen poderia resultar em quantidades variáveis de urina e fezes, alterando o volume total. A colheita do sêmen do robalo-peva diretamente do poro genital com seringas (1mL), possibilitou eliminar esse material indesejado. RANA *et al.* (1992) elucidaram que a contaminação do sêmen, principalmente por urina, freqüentemente ignorada pode significar um aumento de até 80% no volume resultante, refletindo significativamente na qualidade e quantidade do ejaculado.

#### **4.1.2 Densidade espermática**

No robalo-peva a densidade espermática variando de 2,2 a  $2,8 \times 10^{10}$  célsxmL<sup>-1</sup>, pode ser considerada relativamente elevada, levando-se em consideração os limites da maioria das espécies marinhas compiladas por RANA (1996), de  $2,0 \times 10^6$  a  $6,5 \times 10^{10}$  célsxmL<sup>-1</sup>. No robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, FAUVEL *et al.* (1999) encontraram densidades variando entre 5,0 e  $5,5 \times 10^{10}$  célsxmL<sup>-1</sup>, 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 os dados. Entretanto, os valores observados para o robalo-peva foram equivalentes a aproximadamente 10% dos verificados para o halibut do Atlântico (TVEDT *et al.*, 2001), entre 2 a  $6 \times 10^{11}$  célsxmL<sup>-1</sup>.

#### **4.1.3 Motilidade e tempo de motilidade espermáticas**

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

espermatozoides móveis crioconservados não se mostraram férteis (MOUNIB *et al.*, 1968; CAYLOR *et al.*, 1994). Embora os mecanismos que regulam a motilidade e sua duração em peixes marinhos ainda não estejam totalmente elucidados, muitos autores consideram importante o desbalanceamento da concentração dos íons, principalmente dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e da pressão osmótica do plasma seminal em relação ao interior dos espermatozoides, de acordo com a revisão publicada por ALAVI e COSSON (2006).

O sêmen fresco de todos exemplares de robalo-peva examinados após a diluição em água marinha natural com pH 7,0, 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 foi semelhante a obtida para o esperma do peixe-balão *Thamnacomus septentrionalis* (KANG *et al.*, 2004) diluído em água marinha artificial com pH ajustado 7,8. No entanto, foi superior às motilidades do sêmen do robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (FAUVEL *et al.*, 1999), robalo-flexa *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004), ambos com taxa de motilidade ao redor de 80%, e vermelho *Lutjanus campechanus* (RILEY *et al.*, 2004), com 95%, valores obtidos com o sêmen diluído em água marinha natural. A água marinha natural como agente ativador da motilidade tem sido proposta também para outros peixes, como nos linguados *Scophthalmus maximus* e *Pleuronectes ferrugineus* e na tainha *Mugil cephalus* (SUQUET *et al.*, 1994; GWO, 2000).

Os valores médios da duração da motilidade espermática obtidos para o robalo-peva ( $464,6 \pm 47,56$  segundos) ficaram próximos aos obtidos por BILLARD (1978) para o robalo europeu *Dicentrarchus labrax* e a dourada *Spaurus aurata*. Entretanto, variações podem ser confirmadas pelos diferentes procedimentos de preparação do sêmen. Por exemplo, a pré-diluição do sêmen, antes da adição dos ativadores do flagelo, procedimento recomendado por BILLARD e COSSON (1992) para evitar que a formação de pacotes celulares nas amostras examinadas impeça a ativação simultânea dos espermatozoides, principalmente, nas espécies que apresentam altas

densidades espermáticas, fez diminuir drasticamente o tempo de motilidade do robalo europeu de 6 min. (BILLARD, 1978), 5 min. (VILLANI e CATENA, 1991) e 3 min. (SORBERA *et al.*, 1996) em amostras de sêmen sem prévia diluição, para 40s. (FAUVEL *et al.*, 1999) em pré-diluídas, deixando dúvidas quanto aos resultados.

Nas amostras de robalo-peva, esse problema foi contornado, misturando-se com auxílio de lamínula, as gotas do sêmen e da água marinha colocadas separadamente na mesma lâmina. Na seqüência, o material misturado foi coberto com lamínula, evitando-se seu ressecamento. O exame microscópico do material, feito a partir de um único campo de observação e intensidade luminosa, minimizou as distorções de leitura pelo aquecimento desigual do material, que pode ser ocasionado pela luz incidente. STOSS (1983), citando vários autores, discute os efeitos deletérios que a variação da temperatura pode ocasionar na qualidade do movimento espermático.

O volume do sêmen colhido e a densidade espermática foram utilizados na definição das diferentes proporções espermatozóides:ovócito, empregadas no experimento capacidade de fecundação do sêmen fresco e crioconservado. A motilidade e o tempo de motilidade foram utilizados como parâmetros de avaliação dos diluentes, das proporções sêmen:diluyente, das velocidades de congelamento, das concentrações do crioprotetor e da capacidade de fecundação do sêmen crioconservado.

## **4.2 Crioconservação do sêmen**

### **4.2.1 Experimento I – Determinação do diluyente**

Ao contrário do que se observa quando o sêmen dos peixes é refrigerado em temperaturas próximas a 0°C (STOSS, 1983; BILLARD *et al.* 1996), as características seminais são duramente afetadas quando o esperma é exposto em temperaturas criogênicas (GWO, 2000; SUQUET *et al.*, 2000). Nestas temperaturas, 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 espermatozóides 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). Outras qualidades desejadas em um diluente são a capacidade tampão contra os efeitos deletérios das variações do pH resultante do metabolismo dos espermatozóides, a esterilidade e regulação das atividades metabólicas dos espermatozóides (GRAHAM, 1978), a condutividade térmica elevada e solubilidade ao crioprotetor (LEGENDRE e BILLARD, 1980).

Muitos diluentes empregados na crioconservação do sêmen de peixes marinhos se baseiam na sua composição do plasma sangüíneo e/ou seminal (RANA, 1996). No entanto, o plasma seminal obtido por centrifugação, não tem sido um diluente ideal para a crioconservação de espécies de água doce (STOSS, 1983). Já o plasma sangüíneo foi empregado com sucesso em peixes marinhos (HARA *et al.*, 1982). Diluentes simples, utilizando unicamente a glicose, o citrato de sódio ou o cloreto de sódio têm demonstrado um bom desempenho (GWO, 2000). Muitos diluentes selecionados para peixes, entretanto, têm composição química complexa e as informações publicadas não são claras quanto às vantagens do seu uso (RANA, 1996).

Substâncias orgânicas incluindo soro albumina bovina, lecitina, proteínas e gema de ovos de galinha adicionadas ao diluente, também, são largamente utilizadas em salmonídeos, ainda que em outras espécies como o robalo asiático *Lates calcarifer* (PALMER *et al.*, 1993) não se tenha constatado uma elevação nas taxas de fecundação. LEIBO (2000), baseando-se nos argumentos de BAVISTER (1995), advoga que esses compostos de origem biológica podem ser uma importante via de introdução de contaminantes indesejados ao sêmen dos peixes e, portanto, devem ser evitados.

Vários estudos têm sido realizados sobre os efeitos de íons, principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , na iniciação e na duração da motilidade dos

espermatozóides, visando aumentar a qualidade do movimento celular e otimizar a reprodução de espécies de peixes marinhos (ODA e MORISAWA, 1993; 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 ringer para teleósteos marinhos, com valores de pH ajustados para 6,1, 7,8 e 8,2. O melhor desempenho de motilidade e tempo de motilidade espermáticas foram obtidos com o uso da solução básica com pH 8,2. A análise dos dados revelou relação direta entre a alcalinidade do diluente e a duração da motilidade espermática e nenhuma variação nas taxas de motilidade, que permaneceram 70%. Os tempos de motilidade para as soluções diluentes com pH 7,8 e 8,2, respectivamente de  $421,6 \pm 13,09$  e  $610,8 \pm 9,60$ s, foram 16 e 42% superiores ao de pH 6,1 ( $354,7 \pm 8,34$ s). Comparando-se o sêmen crioconservado no diluente pH 8,2 com o sêmen fresco ( $464,6 \pm 47,56$ s), pode-se afirmar que alcalinidade da solução foi responsável pelo aumento do tempo de motilidade em 24%.

O resultado da motilidade do robalo-peva pós descongelamento foi semelhante aos obtidos por FABBROCINI *et al.* (2000) e CABRITA *et al.* (2005) para o esperma da dourada *Spaurus aurata*, diluído em solução de NaCl 1% adicionado de 10% do crioprotetor DMSO. Quando comparado com o sêmen do robalo-flexa *C. undecimalis* diluído em solução balanceada de Hank com 10% do crioprotetor DMSO (TIERSCH *et al.*, 2004), a taxa de motilidade do robalo-peva atingiu quase o dobro. Considerando a taxa de motilidade de 100% obtida para o sêmen do bijupirá *Rachicentron canadum* diluído em solução de glicose adicionada de gema fresca do ovo de galinha (CAYLOR *et al.*, 1994), a motilidade do robalo-peva pode ser considerada bastante inferior. A elevada taxa da motilidade pós-descongelamento para o bijupirá *R. canadum*, entretanto, só foi conseguida após ativação dos espermatozóides com teofilina. Porém, os autores não lograram nenhum êxito na fecundação dos ovócitos.

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 espermatozóides, 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 espermatozóides, acumulados no decorrer do processo de congelamento, provoquem mudanças no pH do sêmen, deletérias aos espermatozóides (GWO, 2000). O pH do diluente ao redor de 8 tem sido indicado como eficiente na preservação de espermatozóides do linguado *Scophthalmus maximus*, pH 8,3 (SUQUET *et al.*, 1994), do bacalhau do Atlântico *Gadus morhua*, pH 8,1 (MOUNIB, 1968), da garoupa *Ephinephelus malabaricus*, pH 8 (CHAO *et al.*, 1992) e do robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, pH 8,1 (FAUVEL *et al.*, 1998).

#### **4.2.2 Experimento II – Determinação da velocidade de congelamento**

Segundo MAZUR (1970), os efeitos subseqüentes da variação contínua da osmolalidade, dos meios intra e extracelular, sobre os espermatozóides depende da velocidade de resfriamento empregada ao sêmen. Uma velocidade relativamente baixa predisporá as células a uma perda rápida de água, com desidratação e redução do tamanho e posterior mudança de pH. Por outro lado, uma velocidade muito rápida poderá não dispor às células o tempo necessário para concluírem o fluxo de água e o equilíbrio dos solutos, favorecendo, ainda, a formação de cristais de gelo no seu interior. Durante o descongelamento, o gelo formado pode se recrystalizar formando blocos maiores que irão danificar as membranas celulares (MAZUR, 1977).

Nos melhores resultados de velocidade de congelamento para o robalo-peva (60 e 90°Cx $\text{min}^{-1}$ ), observamos, em relação ao sêmen fresco, que houve uma queda na motilidade, enquanto que, o tempo de motilidade chegou quase a duplicar. Esse aumento no tempo de motilidade pode compensar a perda observada na motilidade, ou seja, a célula por mais tempo em movimentação

pode suprir essa diferença na taxa de fecundação. Abaixo da velocidade de congelamento de  $60^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ , observou-se uma queda na motilidade e, também, no tempo de motilidade do sêmen crioconservado, podendo comprometer a taxa de fecundação pelo baixo número de células viáveis. Porém, TIERSCH *et al.* (2004) utilizando velocidade de congelamento  $40^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$  para o sêmen do robalo-flecha *C. undecimalis* obteve resultados satisfatórios.

Segundo SUQUET *et al.* (2000), a velocidade de congelamento em peixes marinhos pode variar de 8 a  $99^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ . LEUNG (1987), usando uma velocidade de congelamento de  $30^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ , observou que a motilidade do sêmen descongelado do robalo asiático *L. calcarifer* não foi afetada. No entanto, FAUVEL *et al.* (1998) observaram que com a velocidade de congelamento de  $65^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ , no robalo europeu *D. labrax*, a motilidade espermiática foi similar ao sêmen fresco. DREANNO *et al.* (1997), observaram que para o linguado *Scophthalmus maximus*, o melhor resultado foi  $99^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ , mas em velocidades de  $46^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$  e  $148^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ , ao descongelar o sêmen, a taxa de motilidade diminuiu para 8 e 30%, respectivamente.

#### **4.2.3 Experimento III – 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). Para GWO (2000), a queda na sobrevivência dos espermatozoides em altas diluições, pode estar vinculada, aparentemente, à exaustão dos espermatozoides provocada pelo “efeito de diluição”, sugerindo que sejam usadas proporções de diluição baixas.

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.

#### **4.2.4 Experimento IV – Determinação da concentração do crioprotetor**

A descoberta acidental dos benefícios do glicerol e da albumina do ovo de galinha na crioconservação de sêmen, no final da década de 1940, por POLGE *et al.* (1949), trouxe enormes contribuições para a crioconservação de vários tipos de células e tecidos (DENNISTON *et al.*, 2000). Desde então, inúmeros compostos têm sido escolhidos pela sua qualidade de transferir aos materiais biológicos maior tolerância ao frio (RANA, 1996). O grau de proteção oferecido pelos compostos depende da sua natureza química, peso molecular, permeabilidade e concentração no meio diluidor, além da natureza das células congeladas (MAZUR, 1981).

Os múltiplos crioprotetores utilizados em peixes marinhos foram revisados por SUQUET *et al.* (2000) e GWO (2000). Os crioprotetores albumina de bovinos (BSA) e gema de ovo, não permeáveis à membrana celular, e

etileno, propileno glicol, glicerol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), permeáveis, são os mais testados na crioconservação dos espermatozóides de peixes marinhos, isolada ou associadamente. A interação entre os dois tipos de crioprotetores também tem sido empregada com sucesso no robalo asiático *Lates calcarifer* (LEUNG, 1987).

O DMSO tem sido considerado de baixa toxicidade e eficiente na ação de proteger os espermatozóides durante o resfriamento, reduzindo a formação de cristais de gelo, desse modo, diminuindo o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo (PELETEIRO *et al.*, 1996; SUQUET *et al.*, 2000; CHEHEREGUINI *et al.*, 2001; RIDEOUT *et al.*, 2004; RILEY *et al.*, 2004; CABRITA *et al.*, 2005). Em peixes marinhos, o DMSO, segundo CHAO e LIAO (2001), é um dos crioprotetores mais amplamente utilizados no congelamento do sêmen. Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, sabe-se que o DMSO interage com os fosfolipídeos estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do 0 °C (MC ANDREW *et al.*, 1993; THIRUMALA *et al.*, 2006). Nos peixes marinhos brasileiros sua capacidade de proteção já foi testada na tainha *Mugil platanus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1992, 1999), no robalo-peva *Centropomus parallelus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1998, 2003, 2004 a e b) e no linguado *Paralichthys orbignyanus* (LANES *et al.*, 2006).

Os resultados do congelamento do sêmen do robalo-peva *C. parallelus* foram melhores quando o DMSO foi usado na concentração de 10%. O mesmo foi observado para o robalo-flexa *C. undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004) e para o linguado *S. maximus* (DREANNO *et al.*, 1997). Em peixes marinhos, os melhores resultados têm sido obtidos com DMSO variando de 10 a 20% (WAYMAN *et al.*, 1997), embora as concentrações mais usadas sejam de 7 a 10% (BILLARD *et al.*, 1995). Na crioconservação do sêmen do robalo europeu *D. labrax*, têm sido utilizadas concentrações de DMSO de 5 e 7% (SANSONE *et al.*, 2002) e 10% (FAUVEL *et al.*, 1998; ZILLI *et al.*, 2003, 2005).

Nos nossos resultados, nas concentrações maiores de 10%, a queda da motilidade e do tempo de motilidade do sêmen crioconservado pode ser

explicada pela toxicidade do DMSO, quando em altas concentrações. ZILLI *et al.* (2003), trabalhando com o DNA do sêmen criopreservado do robalo europeu (*D. labrax*), observaram que com a ausência do crioprotetor DMSO ocorre alto grau de fragmentação do DNA, podendo ocasionar problemas com sua utilização, afetando o sucesso da larvicultura. Com raras exceções, concentrações do DMSO nos diluentes variando entre 5 e 20% não têm se mostrado tóxicas aos espermatozoides de várias espécies.

#### **4.2.5 Experimento V – Determinação do tempo de equilíbrio**

A diluição do sêmen em soluções diluentes acrescidas de crioprotetores resulta em elevação da pressão osmótica do meio externo em relação aos espermatozoides. Com a mobilização rápida da água do interior do citoplasma celular para compensar o diferencial de pressão, os espermatozoides sofrem desidratação. Se a desidratação for rápida e extensa o bastante, as células podem ser inviabilizadas antes mesmo do congelamento (DENNISTON *et al.* 2000). No caso das moléculas permeáveis, como o DMSO, após a saída da água para diluir a concentração do meio exterior, parte do crioprotetor caminha para o interior dos espermatozoides e a parte excedente da água que saiu se mobiliza de volta. A extensão da perda de água é maior quando os crioprotetores são do tipo não permeáveis.

Apesar desse mecanismo de regulação osmótica celular sobre as moléculas crioprotetoras, não existe consenso à respeito do tempo de contato do sêmen com a mistura diluente/crioprotetor, prévio ao congelamento. Enquanto HARVEY (1983) prescreve o imediato resfriamento do sêmen logo após a adição da solução crioprotetora ao sêmen, seja qual for a natureza do crioprotetor, outros admitem a necessidade de estabelecer limites de tempo para que os solutos se equilibrem (GROUT e MORRIS, 1987).

Na determinação do tempo de equilíbrio do sêmen do robalo-peva *C. parallelus*, não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) de 30 a 120 segundos. O fato dos espermatozoides de peixes marinhos apresentarem tamanho pequeno, segundo SUQUET *et al.* (2000), pode explicar o baixo

tempo de equilíbrio requerido pelo robalo-peva. A diminuição paulatina da motilidade e do tempo de motilidade espermáticas verificadas nos demais tempos de equilíbrio, podem ser devidas à perda da estabilidade do sêmen em condições prolongadas *in vitro*.

Na bibliografia revista por SUQUET *et al.* (2000), com respeito aos peixes marinhos, os resultados também deixam dúvidas. Por exemplo, com o DMSO no robalo europeu, a capacidade de fecundação decresceu após 2 minutos de equilíbrio (BILLARD, 1978), porém nenhum efeito similar foi observado em relação ao hirame *Paralichthys olivaceus*, entre 10 a 60 min de equilíbrio (TABATA e MIZUTA, 1997).

Para a crioconservação do robalo europeu *D. labrax* não se usa tempo de equilíbrio, o sêmen ao ser diluído imediatamente é envazado na palheta criogênica e em seguida é congelado (FAUVEL *et al.*, 1998; ZILLI *et al.*, 2005). TIERSCH *et al.* (2004), na crioconservação do sêmen do robalo-flecha (*C. undecimalis*) utilizaram o tempo de equilíbrio de 30 minutos, observando baixa motilidade espermática.

#### **4.2.6 Experimento VI – Determinação da capacidade de fecundação do sêmen crioconservado**

A capacidade de fecundação tem sido considerada o melhor critério para a avaliação da qualidade do sêmen (BILLARD *et al.*, 1995; SUQUET *et al.*, 2000). 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 ser inseminados, devido ao número insuficiente de espermatozóides viáveis e/ou ao curto tempo de exposição aos espermatozóides. Taxas razoáveis de ovos viáveis podem ser obtidas quando ovócitos, com qualidade sub-ótima, são expostos a altas concentrações de espermatozóides e/ou expostos por períodos prolongados (GINSBURG, 1972; SUQUET *et al.*, 1995).

No experimento de inseminação artificial com o robalo-peva, proporções crescentes de espermatozóide:ovócito utilizando simultaneamente sêmen fresco e congelado, revelaram para ambos, variação na capacidade de fecundação, com duas fases distintas. Na primeira, foi observado rápido crescimento da capacidade de fecundação, à medida que as concentrações de espermatozóide: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  $1,6 \times 10^5:1$  espermatozóides:ovócito, houve estabilização no crescimento da capacidade de fecundação, com as taxas de ovos viáveis atingindo ao redor de 99%, para ambos 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  $1 \times 10^5:1$  espermatozóides:ovócito, 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  $2,2 \times 10^5:1$  espermatozóides:ovócito, a uma compensação do maior tempo de motilidade dos espermatozóides congelados (média de  $610,8 \pm 9,60$ s) em relação ao sêmen fresco ( $464,6 \pm 47,56$ s).

No robalo-peva, o melhor resultado da capacidade de fecundação (99%) foi observado na concentração  $1,6 \times 10^5:1$  espermatozóides por ovócito, em um lote de 1000 ovócitos. DREANNO *et al.* (1997) utilizando sêmen crioconservado de linguado (*S. maximus*) concluíram que a proporção  $2 \times 10^4$  espermatozóides:ovócito, num lote de 200 ovócitos, foi eficiente. Para o robalo europeu (*D. labrax*), a proporção comumente usada em inseminação com sêmen crioconservado é de  $7 \times 10^4:1$  espermatozóides:ovócito (FAUVEL *et al.*, 1998).

A ausência de estudos comparativos sobre a capacidade de fecundação do sêmen congelado e o fresco, tem sido crítica para uma avaliação precisa da eficiência de muitos protocolos de congelamento usados em peixes, principalmente marinhos (BILLARD *et al.*, 1995; GWO, 2000; SUQUET *et al.*, 2000). Sem esse tipo de análise, indicando a relação ótima de espermatozoides e ovócitos, torna-se impossível estabelecer critérios de comparação entre os inúmeros protocolos desenvolvidos para os peixes marinhos, já que altas taxas de fecundação podem ser obtidas com sêmen em demasia.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas para crioconservação do sêmen de robalo-peva, neste trabalho, conclui-se:

1) O volume do sêmen colhido e a densidade, motilidade e tempo de motilidade espermáticas e a capacidade de fecundação são critérios válidos na determinação da qualidade do sêmen fresco, para efeito do congelamento.

2) A solução diluente baseada na composição iônica do plasma seminal de teleósteos marinhos, com o pH ajustado para 8,2, utilizada para o congelamento do sêmen, independente da proporção sêmen:diluente, garante a preservação da motilidade e tempo de motilidade espermáticas.

3) A velocidade de congelamento de  $90^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$ , deve ser utilizada para preservar a viabilidade dos espermatozóides.

4) A concentração de 10% de DMSO é ideal para dar crioproteção aos espermatozóides, não apresentando toxicidade às células.

5) O sêmen deve ser congelado imediatamente após sua diluição com a mistura diluente/DMSO, por se mostrar sensível a tempos de equilíbrio superiores a 120 segundos.

6) A proporção de  $1,6\times 10^5$  espermatozóides vivos por ovócito, do sêmen crioconservado, é a mínima necessária para inseminar lotes de ovócitos com sucesso.

7) O protocolo de crioconservação do sêmen, desenvolvido neste estudo, é eficiente na preservação das características seminais, resultando em alta taxa de fecundação, semelhante a do sêmen fresco.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. 2006 Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, Londres, 30(1): 1-14.
- ALVES JR., T.T.; CERQUEIRA, V.R.; BROWN, J.A. 2006 Early weaning of fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1860) larvae. *Aquaculture*, Amsterdam, 253(1-4): 334– 342.
- ALVAREZ-LAJONCHÉRE, L; MOLEJÓN, O.G.H. 2001 *Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. 424p.
- ARAÚJO, J.; CERQUEIRA, V.R. 2005 Influência da salinidade na incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). *Acta Scientiarum*, Maringá, 27(1): 85-89.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. 1980 Low temperature preservation of cells, tissues and organs In: ASHWOOD-SMITH, M.J.; FARRANT, J. *Low Temperature Preservation in Biology*. Tunbridge Wells: Pitman Medical Ltd. p.19-44.
- BARROSO, M.V.; CASTRO, J.C.; AOKI, P.C.M.; HELMER, J.L. 2002 Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo (*Centropomus parallelus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 31(6): 2157-2164.
- BART, A.N. 2000 New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.179-187.
- BAVISTER, B.D. 1995 Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, Oxford, 1(2): 91-148.
- 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, vol. 2, Reproduction in the male*. Edinburgh: Churchill Livingstone. p.870-888.
- BILLARD, R.; DUPONT, J.; BARNABÉ, G. 1977 Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* (Poisson téléostéen) pendant la période de spermiation. *Aquaculture*, Amsterdam, 11: 363-367.

- BILLARD, R.; COSSON, J. 1992 Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, Hoboken 261(2): 122-31
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. 1993 Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, Parc d'activités de Courtaboeuf, 6: 67-75.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. 1995 Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, Amsterdam, 129: 95-112.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.M.; SUQUET, M. 1996 Sperm Physiology and Quality. In BROMAGE N.R. e ROBERTS, R.J. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. 2 ed. Cambridge, Blackwel Science, p. 53-76.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, S.B.; POURKAZEMI, M. 2004 Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm. A review. *Aquaculture*, Amsterdam, 236(1-4): 1-9.
- BLAXTER, J.H.S. 1953 Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, Londres, 172: 1189-1190.
- CABRITA, E; ROBLES; V.; CUÑADO, S.; WALLACE, J.C.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M.P. 2005 Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology*, San Diego, 50: 273–284
- CAFFEY, R.H. e TIERSCH, T.R. 2000 Cost analysis for integration of sperm cryopreservation into an existing fish hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 31: 51-58.
- CAMPOS, V.F.; CAVALCANTI, P.V.; LANES, C.F.C.; AMARAL, M.; ROBALDO, R.; MARINS, L.F.F.; SAMPAIO, L.A.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T. 2006 Análise do perfil em SDS-Page pós-descongelamento de plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyanus*. In: AQUACIÊNCIA 2006, 2583, Bento Gonçalves, 14-17/ago./2006. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquaciência. 1 CD-ROM.
- CAVALHEIRO, J.M.O. 2000 *Avaliação do desenvolvimento do camurim *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), em água doce, submetido à alimentação artificial*. São Carlos. 173p. (Tese de Doutorado Apresentado ao Programa de Pós-Graduação de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR).

- CAVALCANTI, P.V.; CAMPOS, V.F.; COLLARES, T.; LANES, C.F.C.; VARELLA, A.S.; ROBALDO, R.; MARINS, L.F.F.; SAMPAIO, L.A.; DESCHAMPS, J.C. 2006 Avaliação da taxa de segmentação de ovos fertilizados com sêmen criopreservado do linguado *Paralichthys orbignyanus*. In: AQUACIÊNCIA 2006, 2584, Bento Gonçalves, 14-17/ago./2006. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquaciência. 1 CD-ROM.
- CAYLOR, R.E.; BIESIOT, P.M.; FRANKS, J.S. 1994 Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture*, Amsterdam, 125(1-2): 81-92.
- CERQUEIRA, V.R. 1995 Testes de indução de desova do robalo, *Centropomus parallelus*, do litoral da Ilha de Santa Catarina com gonadotrofina coriônica humana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, VII., Santos, 22-26/jul./1991. *Anais...* Recife: Associação dos Engenheiros de Pesca de Pernambuco-SUDENE. p.95-102.
- CERQUEIRA, V. R.; BRÜGGER, A. B. 2001 Effect of light intensity on initial survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) Larvae. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 44(4): 343-349.
- CERQUEIRA, V.R., 2002. Cultivo do robalo: aspectos da reprodução, larvicultura e engorda. Florianópolis: UFSC - Ed. do Autor, 94 p.
- CHANDLER, J.E. 2000. Cryopreservation of sperm in dairy bulls. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.84-90.
- CHAO, N.H.; CHEN, H.P.; LIAO I.C. 1975 Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, Amsterdam, 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*, Manila, 5: 103-116.
- CHAO; N.H.; LIAO, I.C. 2001 Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, Amsterdam, 197:161-189.
- CHÁVES, H. 1961 Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescrición de *Centropomus undecimalis* (BLOCH). Contribución de la Estación de Biología Marina del Instituto Tecnológico de Veracruz. México: *Ciencia*, 21(1): 75-83.

- CHEREGUINI, O.; de la BANDA, I.G.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. 2001. Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. *Aquaculture Research*, Oxford, 32(2): 133–143.
- CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. 2000 Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p.20-48.
- CLOUD, J.G.; MILLER, W.H.; LEVANDUSKI, M.J. 1990 Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germplasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *The Progressive Fish-Culturist*, Maryland, 52:51-53.
- DENNISTON, R.S.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. 2000 Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T. R. e MAZIK, P. M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p.59-74.
- DONALDSON, E.M.; SOLAR, I.I.; HARVEY, B. 2000 Induced ovulation and spermiation, and factors influencing gamete qualit. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p.13-19.
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; QUEMENER, L.; COSSON, J.; FIERVILLE, F.; NORMANT, Y.; BILLARD, R. 1997 Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*, Paris, 48: 589-603.
- FABBROCINI, A.; LAVADERA, L.; RISPOLI, S.; SANSONE, G. 2000 Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, San Diego, 40(1): 46–53.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; ZONNO, V.; MENU, B. 1998 Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquatic Living Resource*, Paris, 11(6): 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*, St. John's, 54(2): 356-369.
- FERRAZ, E.M.; CERQUEIRA, V.R.; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CANDIDO, S. 2003. Indução de desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*,

- através de injeção e implante de LHRHa. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 28(2): 125 -133.
- FERRAZ, E.M.; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CERQUEIRA, V.R.; CANDIDO, S. 2004 Validation of an ovarian biopsy method for monitoring oocyte development in the fat snook, *Centropomus parallelus* Poey, 1860 in captivity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 47(4): 643-648.
- FIGUEIREDO, J.L.; MENEZES, N.A. 1980 Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil III. Teleostei (2). São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1-90.
- FRANKS, F. 1982 Physiological water stress. In: FRANKS, F. e MATTHIAS, S.F. *BIOPHYSICS OF WATER*. Chichester: John Wiley & Sons. p.279-294.
- GINSBURG, A.S. 1972 Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. KETER PRESS JERUSALEM (translated from Russia, available from U.S. Dept. of Commerce, NTIS, Springfield, Virginia. p.87-145.
- GODINHO, H.M.; PIMENTEL, C.M.M.; FERRAZ, E. de M.; TIAGO, G.G.; NARAHARA, M.Y.; PAIVA, P. de; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C. da S.; CASTRO, J.I.C.M. 1996 Biologia del robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1860 de la región estuarino-lagunar de Cananéia SP-Brasil (Lat 25° 00` S; Long 47° 55`W). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ACUICULTURA, 9.; Acuicultura en Latinoamerica/Comunicaciones Cortas,1., Coquimbo, Universidad Católica del Norte. *Anais...* p.280-83.
- GODINHO, H.M.; PIMENTEL, C.M.M.; FERRAZ, E.M.; OLIVEIRA, I.R.; NARAHARA, M.Y.; TIAGO, G.G.; PAIVA, P. 1997 Projeto robalo: Estádios gonadais e curva de maturação de *Centropomus parallelus* Poey, 1860 da região estuarino-lagunar de Cananéia (Lat 25° 00` S; Long 47° 55`W). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 12., São Paulo, *Resumos...* p.370
- GODINHO, H.M.; SERRALHEIRO, P.C. da S.; FERRAZ, E. de M.; PIMENTEL, C.M.M.; OLIVEIRA, I. da R.; PAIVA, P. 2000 Reprodução induzida em robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1860. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, 37(1): 37-42.

- GRAHAM, E.F. 1978 Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: GRISAMORE, N.T. e SIEBER, J.M. *The integrity of frozen Spermatozoa*. Washington-D.C.: Proceedings of a Round-Table Conference. p.4-44.
- GRIER, H.; NEIDIG, C. 2000 Gonads and gametes of fishes. In: TIERSCH, T.R. e MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.1-12.
- GROUT, B.W.W.; MORRIS, G.J. 1988 The effects of low temperatures on biological systems. *The Quarterly Review of Biology*, Chicago, 63(3): 325
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R. e MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.138-160.
- HARA, S.; CANTO, J.T.; ALMENDRAS, J.M.E. 1982 A comparative study of various extender for milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) sperm preservation. *Aquaculture*, Amsterdam, 28(3-4): 339-346.
- HARVEY, B. 1983 Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, Amsterdam, 32: 313-320.
- HARVEY, B. 1996 Banking fish genetic resources: the art of the possible. In : CASTRI, F. e YOUNES, T. *Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership*. Wallingford: CAB International. p.439-445.
- HONEYFIELD, D.C.; KRISE, W.F. 2000 Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T.R. e MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.49-58.
- KANG, K.H.; KHO, K.H.; CHEN, Z.T.; KIM, J.M.; KIM, Y.H.; ZHANG, Z.F. 2004 Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunther, 1877) sperm. *Aquaculture Research*, Oxford, 35(15): 1429-1433.
- 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 Research*, Oxford, 28: 471-479.
- LAHNSTEINER, F. 2000 Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research*, Oxford, 31(3): 245-258.
- LANES, C.F.C.; MARTINS, L.F.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.F.; CAVALCANTI, P.V.; ROBALDO, R.B.; SAMPAIO, L.A. 2006

- Criopreservação do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus*. In: Aquaciência 2006, 2364., Bento Gonçalves, 14-17/ago./2006. *Anais...* Bento Gonçalves: Aquaciência. 1 CD-ROM.
- LEGENDRE, M.; BILLARD, R. 1980 Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction, nutrition, development*, Paris, 20(6):1859-1868.
- LEIBO, S.P. 2000 Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.75-83.
- LEMANOVA, N.A.; SAKUN, O.F. 1975 Metodischeskoe posobie pogor monalnoi stimulacii proizvoditelei karpa pré rannom polucenii licinok. *Issledivatel Skogo Instituta*, Izvestiya Gosudartvennogo Nauchno, 88: 3-23.
- LEMOES, D.; NETTO, B.; GERMANO, A. 2006 Energy budget of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed live food. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 144 (1): 33–40.
- 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(1): 13-30.
- MAIA, E.P.; ROCHA, I.P.; OKADA, Y. 1980 Cultivo arraçoado de curimã (*Mugil brasiliensis* Agassiz, 1829) em associação com tainha (*Mugil curema* Valenciennes, 1836) e camorim (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792) em viveiros estuarinos de Itamaracá - PE. In: SIMPOSIO BASILEIRO DE AQUICULTURA, 1., 1978, Recife. *Anais...* Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. p.141-149.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. 1955 Biochemical changes underlying the phenomenon of cold-shock in spermatozoa. *Archivio di scienze biologiche*, Bolonha, 39(6): 578-588.
- MAZUR, P. 1964 Basic problems in cryobiology. In: TIMMERHANS, K.D. *Advances in cryogenic engineering*. Vol 9. New York: Plenum Press. p.28-37

- MAZUR, P. 1970 Cryobiology: the freezing of biological system. *Science*, Washington D.C., 168: 939–949.
- MAZUR, P. 1977 The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, New York, 14(3): 251–272.
- MAZUR, P. 1981 Fundamental cryobiology and the preservation of organs by freezing. In: By KAROW, A.M. e PEGG, D.E. *Organ Preservation for Transplantation*, 2° ed. New York: Marcel Dekker Inc. p.143-175.
- MC ANDREW, B.J.; RANA, K.J.; PENMAN, D.J. 1993 Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: MUIR, J.F. e ROBERTS, R.J. *Recent Advances in Aquaculture*, v. IV. Oxford: Blackwell Science. p.295-336.
- 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, UFSC).
- MILIORINI, A.B. 2006 *Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (Prochilodus lineatus)*. Lavras. 99p. (Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, UFLA).
- MOUNIB, M.S.; HWANG, P.C.; IDLER, D.R. 1968 Cryogenic preservation of Atlantic cod *Gadus morhua* sperm. *Journal of the Fisheries Resources*, Board Canada, 25: 2623-2632.
- MOUNIB, M.S. 1978 Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. Bruxelas, 53: 13-18.
- NEW, M.B. 1997 Aquaculture and the capture fisheries; balancing the scales. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 28: 11-30.
- ODA, A. e MORISAWA, M. 1993 Rises of intracellular  $Ca^{2+}$  and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskeleton*, New Jersey, 25(2):171-178.
- OLIVEIRA, I. da R.; OSTINI, S.; SERRALHEIRO, P.C. S. 2003 Culture of the fat snook *Centropomus parallelus* in sea water recirculation system. In: WORLD AQUACULTURE 2003, 2003., Salvador. *Anais...* p.534.

- PALMER, P.J.; BLACKSHAW, A.W.; GARRETT, R.N. 1993 Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using dimethylsulfoxide and glycerol as cryoprotectants. *Reproduction Fertility Development*, Campbell, 5(3): 285-293.
- 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 Español de Oceanografía*, Madri, 162: 1-13.
- PÉREZ-PINZÓN, M.A.; LUTZ, P.L. 1991 Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, Miami, 48(1): 58-66.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, Londres, 164: 666.
- RANA, K.J. 1995 Cryopreservation of fish spermatozoa. In: DAY, D.G. e McLELLAN, N.R. *Cryopreservation and Freeze Drying Protocols*, New Jersey: The Humana Press. p.49-73.
- RANA, K.J. 1996 Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R. e ROBERTS, R.J. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. 2 ed. Oxford: Blackwell Science. p.53-75.
- RANA, K.J.; GRUPTA, S.D.; MC ANDREWS, B.J. 1992 The relevance of collection technique 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-2April, *Anais...* p.4.
- 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*, Amsterdam, 238: 183-194.
- RIVAS, L.R. 1962 The Florida fishes of the genus *Centropomus*, commonly known as snook. *Florida Academy of Sciences*, Miami, 25(1): 53-64.

- RIVAS, L.R. 1986 Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *American Society of Ichthyologist and Herpetologist*, Copeia, 3: 579-611.
- ROCHA, I.P.; OKADA, Y. 1980 Experimentos de policultivo entre curimã (*Mugil brasiliensis* Agassiz, 1829) e camorim (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792) em viveiros estuarinos (Itamaracá - Pernambuco). In: SIMPOSIO BASILEIRO DE AQUICULTURA, 1, 1978., Recife. Anais... Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. p.163-173.
- RODRIGUES, P.P. 2005 *Aspectos reprodutivos do robalo peva, Centropomus parallelus, na foz do Rio Doce, Linhares-ES*. Vitória. 51p. (Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Espírito Santo).
- SAMPAIO, I.B.M. 1998 *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia – UFMG. 221p.
- SANSONE, G.; FABBROCINI, 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*, San Diego, 44: 229-239.
- SCOTT, A.P. e BAYNES, S.M. 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, St. John's, 17(6): 707-739.
- SEIFFERT, M.E.B.; CERQUEIRA, V.R.; MADUREIRA, L.A.S. 2001 Effect of dietary (n-3) highly unsaturated fatty acids on growth and survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae during first feeding. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, 34(5): 645-651.
- SERRALHEIRO, P.C. da S.; FOGLI da SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M.; FERRAZ, E.M. 1992 Criopreservação do sêmen da tainha *Mugil platanus* em "macro-paillets". In: REUNIAO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA (1ª RAIP), 1., São Paulo, 6-10/abr./1992. *Anais...* p.59.
- SERRALHEIRO, P.C. da S.; OLIVEIRA, I. da R.; GODINHO, H.M. 1998 Fertilização de ovócitos de robalo *Centropomus parallelus*, com sêmen

- crioconservado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE DE AQUICULTURA, 12., Recife, 1998. *Anais...* p.360-1.
- SERRALHEIRO, P.C. da S.; FOGLI da SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M.; OLIVEIRA, I.R. 1999 O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha – *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio líquido. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13., São Carlos. *Anais...* p.508.
- SERRALHEIRO, P.C. da S.; OLIVEIRA, I. da R.; FERRAZ, E.M.; TIBA, R.M. 2003 Sperm cryopreservation of the fat snook *Centropomus parallelus* Poey, 1860. In: WORLD AQUACULTURE, 2003., Salvador, 19-23/maio/2003. *Anais...* p.716.
- SERRALHEIRO, P.C. da S.; OLIVEIRA, I. da R.; OSTINI, S.; FERRAZ, E.M. 2004 (a) Criopreservação de sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860: pH de meios crioprotetores, concentrações de crio-aditivo e de diluente, velocidades de congelamento e taxa de fertilização. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, Vitória, 24-28/maio/2004. *Anais...* p.205.
- SERRALHEIRO, P.C. da S.; OLIVEIRA, I. da R.; OSTINI, S.; FERRAZ, E.M. 2004(b) Reprodução de robalo-peva *Centropomus parallelus*: uso de reprodutores mantidos em condições de cativeiro no ambiente estuarino e no oceânico. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, Vitória, 24-28/maio/2004. *Anais...* p.243.
- SHAFLAND, P.L.; FOOTE, K.J. 1983 A lower lethal temperature for fingerling snook, *Centropomus undecimalis*. *Northeast Gulf Science*, Miami, 6(2):175–178.
- SILVA, J.E. 1976 *Fisioecologia do camorim, Centropomus undecimalis (Bloch, 1792). Estudo experimental em ambiente confinado*. São Paulo. 101p. (Tese de doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo).
- da SILVA ROCHA, A. J.; GOMES, V.; NGAN, P.V.; PASSOS, M. J. A.C.R.; FÚRIA, R.R. 2005 Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Amsterdam, 316: 157-165.

- SORBERA, L.A.; MYLONAS, C.C.; ZANUY, S.; CARRILO, M.; ZOHAR, Y. 1996 Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the seabass. *Journal of Experimental Zoology*, Hoboken, 276(5): 361-368.
- SOUZA, R.L.T.B.N. de 1998 *Aspectos da reprodução do robalo, Centropomus parallelus Poey, 1860 (Pisces: Centropomidae) da região cacauzeira do Estado da Bahia: um subsídio ao cultivo*. Salvador. 164 p. (Dissertação de Mestrado em Produção Aquática, Universidade da Bahia).
- STOSS, J. 1983 Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. *Fish Physiology*. New York: Academic Press. p.305-350.
- SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; DORANGE, G.; CHAUVAUD, L.; MUGNIER, C.; FAUVEL, C. 1994 Sperm features in turbot *Scophthalmus maximus*: A comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources*, Parc d'activités de Courtaboeuf, 7: 283-294.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, Oxford, 31(3): 231-243.
- TABATA, K.; MIZUTA, A. 1997 Cryopreservation of sex reversed gynogenetic female sperm in Hirame. *Fisheries Science*, Tóquio, 63(3): 482-483.
- TAYLOR, M.J. 1987 Physio-chemical principles in low temperature biology. In: GROUT, B.W.W. e MORRIS, G.J. *Effects of low Temperature on Biological systems*. Londres: Edward Arnold Ltd. p.360-390.
- TEMPLE, S.; CERQUEIRA, V.R.; BROWN, J. A. 2004 The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1860). *Aquaculture*, Amsterdam, 233(1-4): 205–217.
- TIERSCH, T.R. 2000 Introduction. In: TIERSCH, T.R. e MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.xix-xxvi.
- TIERSCH, T.R., 2001. Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine Biotechnology, Special Issue: Aquaria Models of Human Disease 3*, New York, S212-S223

- 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*, Oxford, 35: 278-288.
- THIRUMALA, S.; CAMPBELL, W.T.; VICKNAIR, M.R.; TIERSCH, T.R.; DEVIREDDY, R.V. 2006 Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, New York, 66(4): 964–973
- TVEDT, H.B.; BENFEY, T.J.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; POWER, J. 2001 The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 194(1): 191-200.
- VILLANI, P.; CATENA, C. 1991 Criopreservazione di gamete maschili di sea bass (*D. labrax*): soluzioni e metodologie, *Rivista Italiano Acquacoltura* 26: 217-226.
- VIVEIROS, A.T.M. 2002 Semen collection and preservation in African catfish, *Clarias gariepinus*. 146p. (PhD Thesis, Wageningen University).
- WAYMAN, W.R., THOMAS, R.G., TIERSCH, T.R., 1997. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, Paris, 47(8): 1519–1529.
- WAYMAN, W.R.; TIERSCH, T.R. 2000 Research methods for cryopreservation of sperm. In: TIERSCH, T.R. e MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.264-279.
- WORM, B.; BARBIER, E.B.; BEAUMONT, N.; DUFFY, J.E.; FOLKE, C.; HALPERN, B.S.; JACKSON, J.B.C.; LOTZE, H.K.; MICHELI, F.; PALUMBI, S.R.; SALA, E.; SELKOE, K.A.; STACHOWICZ, J.J.; WATSON, R. 2006 Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, Washington D.C., 314(5800): 787-790.
- ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; STORELLI, C.; VILELLA, S. 2003 Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, San Diego, 47(3): 227-235.
- ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; ROSSANO, R.; STORELLI, C.; VILELLA, S. 2005 Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biology of Reproduction*, Washington D.C., 72(5): 1262-1267.