



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Pesca e Aquicultura

KLEYDSON THYAGO ARAUJO DE OLIVEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN DE PEIXE DE ÁGUAS DOCES
TROPICAIS: UMA REVISÃO TECNOLÓGICA**

Recife, dezembro de 2021



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Pesca e Aquicultura

KLEYDSON THYAGO ARAUJO DE OLIVEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN DE PEIXE DE ÁGUAS DOCES
TROPICAIS: UMA REVISÃO TECNOLÓGICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Recife, dezembro de 2021

Dedicatória

*Dedico este trabalho a todos aqueles que, à sua maneira
contribuíram para que este trabalho pudesse ser finalizado...
Aos meus pais e irmã, aos meus amigos e aos meus
professores.*

Agradecimentos

Agradeço ao Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE pela acolhida, nesses mais de cinco anos de jornada, que teve direito a uma greve (justa, muito justa!) de quase 5 meses, uma pandemia que nos fez ficarmos separados por mais de 2 anos e a impossibilidade de encerrar o curso ao lado daqueles que me acompanharam por longos anos, meu muito obrigado.

Agradeço aos meus pais pela paciência em enfrentar uma nova graduação e permitirem que eu chegasse onde cheguei, não seria capaz sem vocês! Muito obrigado. À minha irmã, que me ajudou em vários momentos da graduação, meu muito obrigado.

Aos meus amigos “*de copo e de cruz*” agradeço a incrível jornada que foi - e está sendo - esta graduação. À Wilka Granjeiro, agradeço as conversas, as risadas, os ensinamentos, os desabafos e os segredos trocados; à Gisely Costa, agradeço a ajuda em momentos difíceis, as conversas e por fazer Wilka feliz. À Chirley Matilde, agradeço o apoio, às trocas de experiências, as ajudas em horas de necessidade, à Indira Macedo, agradeço por chegar como uma monitora e virar uma amiga pra todas as horas. Aos meus amigos Bruno Borba e M^a Raissa Trindade, agradeço a acolhida na turma e obrigado por me aceitarem de tão bom grado. Agradeço as horas dispensadas em trabalhos, exercícios, desabafos, conversas, jogos, muito obrigado por fazerem parte do meu dia-a-dia por esses anos. Agradeço também a Vinicius Felipe por fazer parte desta turma de apenas quatro e todo o caminho feito ao nosso lado. Ao João Paulo, agradeço as ajudas durante a graduação e a dedicação.

Agradeço aos meus professores em especial a minha orientadora a Prof^a Juliana Santos pela paciência e dedicação de apoio nesse momento tão difícil e tão crítico na vida de qualquer formando. Obrigado pelas experiências, pelas dicas, pelas correções e, mais uma vez, pelo apoio, isso é muito importante. Muito obrigado. Agradeço a professora Danielli Dantas pelo apoio e suporte.

Agradeço ao prof^o Manlio Ponzi Junior pelos ensinamentos de alto nível adquiridos nesses anos de convivência, pelas conversas e pelos processos de ensino-aprendizagem que tivemos ao longo desses anos. Muito obrigado.

Agradeço aos funcionários do departamento de Pesca e Aquicultura e a todos os funcionários da Base de Piscicultura da UFRPE, que contribuíram, à sua medida, para que eu pudesse chegar onde cheguei, não se faz nada sozinho.

Artigo científico

Criopreservação de semên de peixe de águas doces tropicais: uma revisão tecnológica

Cryopreservation of tropical freshwater fish semen: a technology overhaul

Kleydson Thyago Araujo de Oliveira; Juliana Ferreira dos Santos

Resumo

O objetivo deste artigo é identificar as técnicas utilizadas na criopreservação de semên de peixes. A metodologia utilizada foi a revisão integrativa de artigos que versam sobre o tema pesquisados no Portal de Periódico da Capes e foram escolhidos nove artigos para serem analisados, pois continham todas as informações analisadas pelo pesquisador. Também foi desenvolvida uma tabela onde consta um resumo da técnica utilizada na criopreservação, em especial os aspectos biotecnológicos, como: diluentes, crioprotetores, embalagem, congelamento, armazenamento, descongelamento e a solução ativadora. Foi desenvolvido um mapa mental da técnica de criopreservação, desde a preparação do semên fresco, até o descongelamento e eventual uso. A análise da bibliografia nos mostra que a glicose é o diluente mais utilizado, juntamente com o Dimetilsufóxido – DMSO, como crioprotetor interno, o produto é acondicionado em canudos ou microtubos, o congelamento é feito principalmente usando um Dry Shipper e posterior guarda no nitrogênio líquido (-196°C) e o descongelamento é feito de forma rápida e por um tempo curto e a posterior ativação se faz com cloreto de sódio ou bicarbonato de sódio. Conclui-se que a técnica é bem descrita e já há um protocolo para o desenvolvimento da criopreservação.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, glicose, Dimetilsufóxido, dry shipper, descongelamento.

Abstract

The aim of this article is to identify the techniques used in cryopreservation of fish semen. The methodology used was the integrative review of articles on the topic researched on Capes' Journal Portal and nine articles were chosen to be analyzed, as they contained all the information analyzed by the researcher. A table was also developed which contains a summary of the technique used in cryopreservation, in particular the biotechnological aspects, such as: diluents, cryoprotectants, packaging, freezing, storage, thawing and the activating solution. A mental map of the cryopreservation technique was developed, from fresh semen preparation to thawing and eventual use. The bibliography analysis shows that glucose is the most used diluent, together with Dimethylsulfoxide - DMSO, as an internal cryoprotectant, the product is packaged in straws or microtubes, freezing is mainly done using a Dry Shipper and subsequent storage in liquid nitrogen (-196°C) and the thawing is done quickly and for a short time and the subsequent activation is done with sodium chloride or sodium bicarbonate. It is concluded that the technique is well described and there is already a protocol for the development of cryopreservation.

Keywords: *Colossoma macropomum*, glucose, Dimethylsulfoxide, dry shipper, thawing.

Lista de figuras

	Página
Figura 1 - Mapa mental do processo de criopreservação de semên.....	16
Figura 2 - Espécies utilizadas nos experimentos	17
Figura 3 - Diluentes utilizados.....	18
Figura 4 - Crioprotetores utilizados.....	18

Lista de tabelas

Página

Tabela 1 - Resumo dos artigos analisados	19
--	----

Sumário

	Página
1 - Introdução	10
2 - Material e método.....	11
3 - Desenvolvimento.....	11
3.1 - Processamento da amostra	12
3.2 - Diluente.....	12
3.3 - Crioprotetores	13
3.4 - Embalagens.....	14
3.5 - Congelamento.....	14
3.6 - Armazenamento	15
3.7 - Descongelamento.....	15
3.8 - Solução ativadora.....	15
4 - Avaliação da bibliografia	16
5 - Conclusão.....	19
6 - Referências bibliográficas.....	20

1. Introdução

Os peixes dulciaquícolas são aqueles que vivem toda sua vida na água doce ou que passam parte primordial dela neste ambiente, sendo divididos em peixes primários e secundários. Os primários são aqueles que não resistem à água salgada, como os peixes da família *Cyprinidae*, *Cobitidae* e a maioria dos siluriformes. Já os secundários são aqueles que podem viver em algum momento em água salgada, como é o caso das famílias *Cottidae*, *Lotidae* e *Valenciidae* (Medina-Robles *et al.*, 2020).

É sabido que os peixes ocupam cerca de 10% da biodiversidade das espécies descritas e um quarto das espécies descritas de vertebrados no mundo (Freyhof e Brooks, 2011; Smith *et al.*, 2014). Na América Latina a diversidade de peixes de água doce é tamanha que chegamos a ter mais de cinco mil espécies, o que representa um terço do estimado mundial (Reis *et al.*, 2016).

Entretanto, problemas antrópicos tem feito uma depleção nesse número de espécies, como a urbanização, problemas ambientais, contaminação das águas, exploração pesqueira em conjunto com o pouco avanço de políticas de sustentabilidade e as represas hidrelétricas tem diminuído as populações em 83% desde dos anos de 1970 (Reis *et al.*, 2016; Volpedo *et al.*, 2017). Dessa forma, os riscos de extinção dos peixes de água doce são maiores do que os animais terrestres, visto que eles são mais sensíveis a tais mudanças (Volpedo *et al.*, 2017).

Estima-se que a taxa de extinção dos peixes de água doce é de 112 a 855 vezes mais alta que as taxas de extinção natural (Tedesco *et al.*, 2017), sendo que na América do Sul, 4 a 10% das espécies enfrentam algum risco de extinção (Reis *et al.*, 2016). Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de biotecnologias que tentem suprir essa perda de material genético (Rajasekharan, 2017), com a criação de Bancos de Recurso Genéticos cuja sigla é conhecida internacionalmente por GRB (Medina-Robles *et al.*, 2020).

No Brasil, por exemplo, oito espécies estão ameaçadas de extinção no Rio São Francisco, segundo o Comitê da Bacia do São Francisco (CBHSF), são elas: mandi-brague, pirá, pirapitinga, lambari, pacamão, cascudo do mucutu, cambeva e barrigudinho. Isso se dá visto a quantidade de hidroelétricas que há no Rio São Francisco, apontam os estudiosos.

Dessa forma, é necessário que haja formas de preservar a esses peixes, seja pela

criação em cativeiro ou na guarda de material genético. Nesta esteira as pesquisas com criopreservação tem sido feitas, no intuito de também preservar material genético de peixes e geralmente são utilizados os espermatozoides, pois ocupam menos espaço por serem pequenos e são mais resistentes ao frio, mas podem ser utilizadas células somáticas, células germinais,, ovócitos e embriões, sendo os espermatozoides mais utilizados (Martínez-páramo *et al.*, 2017).

Além da conservação genética de populações ameaçadas de extinção por ações humanas, a criopreservação facilita as trocas de material genético entre criadores, evitando cruzamentos entre parentes próximos, e é uma ótima alternativa para fazer reprodução assistida de peixes como o tambaqui, por exemplo.

Assim, este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão tecnológica dos principais artigos publicados, acerca do tema da criopreservação de sêmen de peixe, no portal de Periódico da Capes.

Objetivamos com este trabalho

2 - Material e método

A revisão integrativa da literatura, foi utilizada como método e consistiu nas seguintes etapas: primeiramente, foi identificado o tema de pesquisa, selecionadas as palavras-chaves e, posteriormente, a pesquisa dos artigos no banco de dados do Portal de Periódico da Capes. As palavras-chaves utilizadas foram, em inglês: spermatozoid, semen, sperm, seminal liquid, cryopreservation. Em português: espermatozoide, sêmen, sêmen, esperma, líquido seminal, criopreservação e em espanhol, as palavras foram: esperma, semen, semen, esperma, líquido seminal, criopreservación.

No banco de dados foram selecionados artigos que continham, no título, palavras que faziam referência a estudos sobre a temática abordada neste estudo e os publicados nos últimos cinco anos, foram fruto de análise. No banco de dados, aqueles publicados em qualquer tempo e em língua inglesa, retornaram como resultado 30 artigos e, nos últimos cinco anos, retornaram como resultado 8 artigos.

Em língua portuguesa, artigos publicados em qualquer tempo, somam o resultado de 6 seis trabalhos e nos últimos 5 anos apenas 3 trabalhos. Em língua espanhola, foram

obtidos 15 resultados para qualquer tempo e 4 nos últimos cinco anos. Após a seleção dos artigos, foram lidos os resumos e, uma vez se encaixando no tema da pesquisa, os artigos eram lidos e resumidos para compor este trabalho.

Após a leitura, foi produzida uma tabela, onde são encontrados os seguintes dados: autor e ano, qual técnica foi utilizada, obtenção do sêmen e a conclusão desses artigos. Além disso, um mapa mental sobre o processo de criopreservação foi criado a partir da leitura dos artigos.

3 - Desenvolvimento

Os protocolos de criopreservação são procedimentos com metodologia estabelecida cujo objetivo final é manter viva as células espermáticas, ao fim do processo (Martínez-páramo *et al.*, 2017), onde qualquer mudança afeta diretamente os parâmetros de qualidade (Lahnsteiner *et al.*, 2011).

O primeiro processo criobiológico foi o modelo básico de Mazur, de 1963, que versa sobre a formação do gelo intracelular em função da velocidade de resfriamento, a permeabilidade da membrana e as dimensões da célula (Medina-Robles *et al.*, 2020). Posterior a isto, temos o desenvolvimento do modelo bioquímico que tinha a capacidade de prever a sobrevivência de uma célula em função da velocidade de congelamento e descongelamento (Mazur *et al.*, 1972).

O produto destas duas técnicas permitiu que fosse criado uma metodologia que permitisse otimizar as velocidades de congelamento e descongelamento em função do transporte de matéria e energia (Woelders *et al.*, 2004). Para um melhor entendimento, serão descritos a seguir as principais etapas do processo de criopreservação.

3.1 - Processamento da amostra

Para proteger os espermatozoides de danos causados pelo congelamento utilizam-se inúmeros diluentes, que variam de acordo com cada técnica, levando em consideração a espécie utilizada e escolhendo aquele que melhor se adapta (Medina-Robles *et al.*, 2020). Sabe-se que durante a diluição, o espermatozoide regula seu tamanho conforme a disponibilidade de soluto no diluente, logo pode sofrer danos celulares visto a difusão da água (Fernández *et al.*, 2009). Desta forma, a fim de evitar

danos, o diluente deve ser adequado de tal forma que permita evitar danos osmóticos e evitar que os espermatozoides sejam ativados (Draper & Moens, 2009).

3.2 - Diluente

Um diluente numa solução de criopreservação nada mais é que uma solução em que se dilui o sêmen antes do congelamento. Utiliza-se uma combinação de um extensor, um crioprotetor interno e um crioprotetor externo em um determinado pH e uma determinada osmolalidade (Medina-Robles *et. al.*, 2020).

Recomenda-se que o diluente tenha a osmolalidade superior à do plasma seminal, visto que, nestas condições, a motilidade espermática é inibida na maioria dos peixes de água doce (Medina-Robles *et. al.*, 2020), sendo esta inibição necessária para preservar a qualidade seminal durante o armazenamento (Carneiro *et al.*, 2012).

O diluente geralmente é composto de glicose e cloreto de sódio em diferentes concentrações. A água de coco em pó também tem sido utilizada, visto seu alto teor de minerais. Um extensor simples pode ser feito com glicose a 5% que é estável e pode ser utilizado em grandes fazendas sem a necessidade de grandes trabalhos de laboratório (Viveiros, Godinho, 2009).

A diluição do sêmen tem efeitos deletério nos espermatozoides, fazendo com que os antioxidantes naturais se reduzam no plasma seminal, tornado-os mais expostos ao estresse oxidativo (oxidação de proteínas) e a fragmentação do DNA (Medina-Robles *et. al.*, 2020). O ácido ascórbico e a vitamina E, têm sido de fundamental importância, visto que evitam as reações em cadeia induzidas pelos radicais livres (Cabrita *et al.*, 2011).

3.3 - Crioprotetores

São substâncias essenciais para a sobrevivência das células e proporcionam um ambiente nutricional e osmoticamente ideal para o sêmen, reduzindo a taxa de congelamento e as lesões celulares mecânicas (Varela-Junior *et al.*, 2015). Assim que o espermatozoide entra em contato com o crioprotetor, há uma incrementação na concentração intracelular de solutos, promovendo a osmose da água para o meio extracelular, permitindo que os cristais de gelo se formem fora da célula, onde não há efeitos danosos (Medina-Robles *et. al.*, 2020).

Entretanto, o excesso de crioprotetores pode fazer com que haja uma desidratação bastante acentuada da célula, o que causa danos celulares irreversíveis (Benson, 2015), podendo ser, em elevadas concentrações, tóxicos (Yasui *et al.*, 2012) ou mesmo causando a peroxidação lipídica (Isachenko *et al.*, 2018).

O glicerol é o primeiro crioprotetor interno reportado, mas existem outras substâncias que agem de forma análoga, sendo elas o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metilglicol (Viveiros & Godinho, 2009), sendo o primeiro utilizado em muitos ensaios, embora seu desempenho não seja tão satisfatório, como relatado por Carneiro *et al.* (2012) que mostrou uma motilidade de 5-10% nos espermatozoides descongelados. O metilglicol tem sido utilizado com êxito em peixes de água doce, embora alguns autores como, Shaliutina-Kolešová *et al.* (2015) mencionam que não é eficaz.

Autores como Oliveira *et al.* (2016), Pastrana *et al.* (2018), Medina-Robles *et al.* (2019), Pinheiro *et al.* (2016) e Galo *et al.* (2020), quando trabalharam com a criopreservação do sêmen de *Colossoma macropomum*, utilizaram o dimetilsulfóxido (DMSO) e apenas Oliveira *et al.* (2016) utilizou o metilglicol.

Os crioprotetores externos são aqueles que penetram nas células, ajudando a estabilizar a membrana, segundo Viveiros & Godinho (2009), e o mais utilizado atualmente é a gema de ovo.

Na maioria dos casos ela têm mostrado parâmetros de qualidade bem altos e oferece proteção celular visto a presença de lipoproteínas de baixa densidade que se aderem a parede celular e a protegem do dano mecânico, como nos afirma Medina-Robles *et al.* (2020). Contudo, ela é pouco estável e sua composição é difícil de padronizar por ser muito viscosa, assim, adicionada num diluente, prejudica a motilidade dos espermatozoides e dificulta a caracterização visual das células no microscópio (Carneiro *et al.*, 2012).

3.4 - Embalagens

As embalagens podem influenciar na taxa de congelamento e descongelamento, na eficiência de armazenamento do pós-descongelamento, na identificação da amostra e na biossegurança, como descrito por Medina-Robles *et al.* (2020). Os mesmos autores

dizem que o emprego de canudos é muito comum, entretanto há a utilização de criotubos, que são fáceis de preencher, rotular e tem um maior volume disponível para fertilização.

3.5 - Congelamento

Esta etapa é muito importante, sendo classificada como um Ponto Crítico de Controle (PCC) pois, há a formação de cristais de gelo que podem ser internos ou externos às células. Desta forma provocam lesões mecânicas as estruturas celulares, se forem internos, pois o congelamento é, por si só, letal se não houver um diluente de crioconservação. Já os cristais externos, segue o autor, são inócuos.

O congelamento, na maior parte dos trabalhos analisados, utilizou-se Dry Shipper com armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C , por períodos que variaram de 4,6 horas até 8 meses, como foi o caso do trabalho de Medina-Robles *et al.* (2019).

O choque térmico e o estresse osmótico e oxidativo, afetam a membrana celular, as mitocôndrias e a estrutura da cromatina, e, dessa forma, deve ser cuidadosamente avaliada, para um melhor resultado (Watson *et al.*, 2001).

3.6 - Armazenamento

Os processos deletérios dos materiais não são relacionados ao armazenamento e sim ao processo de congelamento e descongelamento em si, sendo que o tempo de armazenamento não deve ser prolongado visto que o tempo de conservação aumenta o valor de manutenção (Medina-Robles *et al.*, 2020).

3.7 - Descongelamento

Os efeitos mais danosos no sêmen ocorrem no processo de descongelamento (Isachenko *et al.*, 2018), pois quanto mais lento o processo de descongelamento maior será o dano, uma vez que os cristais de gelo se fundem e formam cristais maiores, causando mais problemas, sendo o inverso verdadeiro, ou seja, quanto mais rápido o descongelamento menor será a formação de cristais e menos danoso será para célula, nos mostra Benson (2015).

Autores como Martínez & Pardo (2013) mostraram que uma taxa lenta de congelamento e uma taxa rápida de descongelamento trazem benefícios aos

espermatozoides e as temperaturas de descongelamento variam de acordo com a espécie trabalhada.

3.8 - Solução ativadora

Para que haja a ativação do sêmen é necessário certa osmolalidade, concentrações de íons, pH, temperatura e taxa de diluição (Alavi et al., 2006; Cosson, 2010), sendo que há diferenças muito grandes entre a solução ativadora para peixes de água marinha e para peixes de água doce, sendo verdadeiro também para diferentes espécies dentro do mesmo ambiente, nos afirma Martínez-Páramo et al. (2017). Geralmente as soluções ativadoras de peixes de água doce são hiposmóticas em relação ao líquido seminal, mas pode haver ativação através de meios isotônicos.

São empregadas várias soluções ativadoras e Medina-Robles *et al.* (2020) nos apresentam as mais comuns: NaCl (0,3%) e NaHCO₃ (1%), que foram testadas por Carneiro et al. (2012) em esperma de *C. macropomum* e mostraram que não há diferenças estatísticas significativas entre as duas soluções, alcançando motilidades superiores a 80%, com duração média de 50 segundos.

4 - Avaliação da bibliografia

A partir da análise dos nove artigos, foi possível desenvolver um mapa mental com a ajuda do site <https://www.mindmeister.com/pt>, com as principais etapas da criopreservação de sêmen de peixes de água doce tropical., como podemos ver, abaixo, na Figura 1:

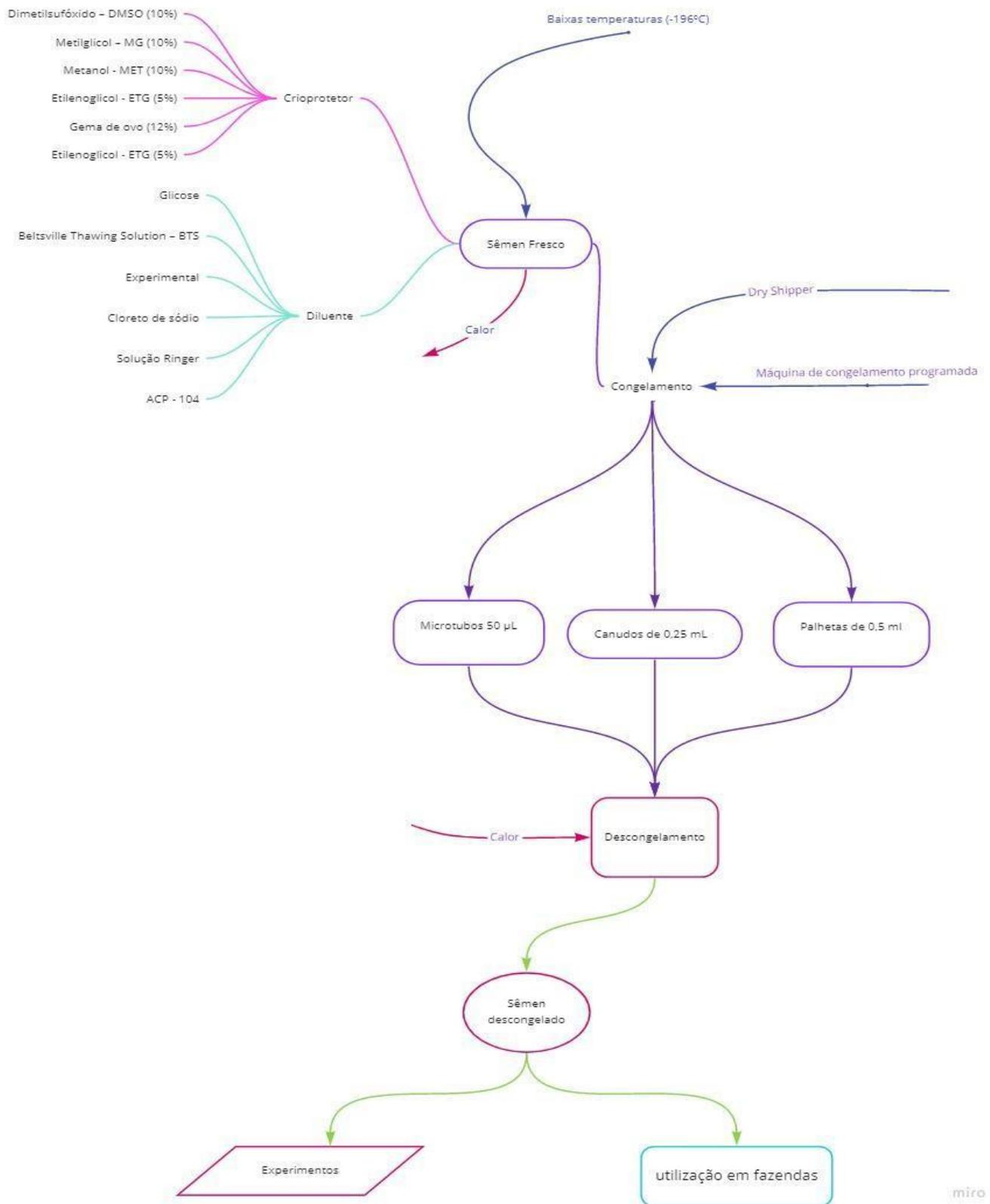


Figura 1 - Mapa mental

Fonte: o autor

O mapa mental acima nos mostra as etapas da criopreservação de semên de peixe, desde a adição, ao semem, dos diluentes e crioprotetores até o descongelamento para eventual uso, seja para estudo ou em fazendas de criação. Notamos que o processo é o mesmo, variando apenas os compostos utilizados.

Como crioprotetores podemos ver a utilização do DMSO ou BTS, já para os diluentes a glicose ou algum utilizado de forma experimental, como foi feito por Pastrana et al. (2018), quando trabalhou com semên de tambaqui. Este mapa facilita nossa visualização do processo como um todo, sendo importante para identificar as partes que compõem o processo, a fim de aprimorá-lo e questioná-lo, como é o trabalho da ciência.

Além do mapa mental, foi criada uma tabela com as informações mais relevantes dos artigos analisados, desde espécies trabalhadas, diluentes e crioprotetores utilizados, a forma de congelamento e descongelamento e a solução ativadora desse espermatozoide, quando houve esta informação. As informações estão contidas na tabela 1.

Tabela 1	
	<i>Colossoma macropomum</i>
Especies trabalhadas	<i>Prochilodus brevis</i> <i>Leiarius marmoratus</i>
Diluentes	Glicose; Beltsville Thawing Solution – BTS; Cloreto de Sódio (NaCl); Solção Ringer; ACP-104 (água de coco em pó).
Crioprotetor	Dimetilsufóxido – DMSO; Metilglicol – MG; Etilenoglicol - ETG; Gema de ovo;
Embalagens	Canudos; Microtubos de centrifuga; Palhetas 0,5 mL.
Congelamento / Resfriamento	Dry Shipper; Maquina de congelamento programada; Nitrogenio líquido
Armazenamento	96 h - 8 meses
Descongelamento	Banho-maria variando de 5s a 30°C até 8 mim a 45°C
Solução Ativadora	Água destilada; Cloreto de sódio (NaCl); Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃

Tabela 1 - Tabela-resumo dos artigos selecionados

fonte: o autor

Após a descrição das principais fases para uma criopreservação foram pontuadas as principais características observadas nos artigos, dentre elas podemos citar as espécies de peixes mais estudadas.

De acordo com os artigos lidos, o tambaqui foi um dos peixes que mais serviu como análise, pois, segundo Oliveira *et al.* (2016) o seu consumo vem aumentando no Brasil, visto sua rusticidade, sua carne saborosa e por isso, há o interesse no desenvolvimento de biotecnologias associadas a reprodução deste peixe, muito embora este aumento no consumo leva ao declínio de populações naturais, sendo a aquicultura uma saída para evitar esta exploração.

Com relação aos diluentes utilizados, o que mais aparece nos artigos é a Glicose a 5,0%, que foi utilizada por autores como Medina-Robles *et al.* (2019) no processo de criopreservação de sêmen de tambaqui, e também utilizado por Almeida-Monteiro *et al.* (2017) utilizando sêmen de *Prochilodus brevis*.

Os principais crioprotetores observados utilizados foram o DMSO, o metilglicol, o etilenoglicol e a gema de ovo, que é utilizada como crioprotetor externo, a fim de evitar que os cristais de gelo maculem as células espermáticas.

5 – Conclusão

Este trabalho objetivou fazer uma revisão tecnológica da criopreservação de sêmen de peixes de água doce tropicais, com o intuito de verificar quais as técnicas estão sendo utilizadas nos artigos científicos publicados, tendo em vista que estas técnicas favorecem a preservação do sêmen, para posterior utilização.

Observou-se claramente que o congelamento rápido produz efeitos deletérios nestas células e que a utilização de um diluente e de um criopreservante, acompanhados das etapas descritas neste levantamento, tem a capacidade de mitigar esses efeitos.

Além disto, a forma como o produto é descongelado também é de fundamental importância, uma vez que o descongelamento realizado de forma inadequada (com menos velocidade) também proporciona baixa qualidade dos espermatozoides.

Assim, espera-se que o levantamento realizado com a junção do mapa mental e da tabela-resumo dos nove artigos analisados, possam contribuir com o melhor entendimento do processo de criopreservação de semên de peixes de água doce tropicais, e que esta ferramenta possa ser ainda mais explorada e estudada para o desenvolvimento produtivo no Brasil e no mundo.

6 - Referências bibliográficas

- Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 2006; 30 (1): 1-14.
- Benson JD. 2015. Modeling and Optimization of Cryopreservation. En: Wolkers WF, Oldenhof H (Editores). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press. Hertfordshire, UK. p. 83 – 120.
- Cabrera E, *et al.*. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science*, 2011; 125: 189-195.
- Carneiro, PCF, *et al.*. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters*, 2012; 33 (5): 385-393.
- Cosson J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology*, 2010; 76 (1): 240-279.
- Draper BW, Moens CB. A High-Throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. *Journal of Visualized Experiments*, 2009; (29): e1395.
- Fernández A, *et al.*. Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*, 2009; 14 (1): 17-25.
- Freyhof J, Brooks E (Editores). 2011. *European Red List of Freshwater Fishes*. Office of the European Union, Luxemburgo, p. 70.
- Irena B, Sarosiek B, Dryl K, Judycka S, Szczepkowska B. The effect of cryopreservation extender on sperm motility and hatch success in northern pike (*Esox lucius*). *Aquaculture*, 2020; 514: 734482.
- Isachenko V, Sánchez R, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko E, Merzenich M. Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa: fish as a model of human. *Andrologia*, 2018; 51 (1): e13166.
- Lahnsteiner F, *et al.*. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, 2011; 76 (5): 882-890.
- Martínez-páramo, S, *et al.*. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 2012; 77 (6): 1129-1136.
- Martínez JG, Pardo S. Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in bocachico *Prochilodus magdalenae* (pisces, characiformes). *Revista MVZ Cordoba*, 2013; 18 (1): 3295-3303.

Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury: Evidence from Chinese Hamster Tissue-culture Cells. *Experimental Cell Research*, 1972; 71 (2): 345-355.

Medina-Robles, Victor M. *et al.*. Seminal Cryopreservation in Freshwater Fish: Biotechnological, Cellular and Biochemical Aspects. *Orinoquia*, julho - dezembro 2020; 24(2)51-78.

Pinheiro JPS, Melo-Maciel MAP, Linhares FRA, Lopes JT, Almeida-Monteiro PS, Pinheiro RRR, Torres TM, Salmito-Vanderley C. Use of glucose or BTS TM combined with DMSO or methylglycol under two different freezing protocols for the cryopreservation of sperm from the common curimatã (*Prochilodus brevis*). *Animal Reproduction*, 2016; 13 (4): 779-786.

Rajasekharan, P. E. 2017. Conservation of Bioresources. *in: Abdulhameed, S et al.*. Bioresources and Bioprocess in Biotechnology. Springer Nature, Singapura. p. 25-47.

Reis, R. E, *et al.*. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 2016; 89 (1): 12-47.

Shaliutina-Kolešová A, Cosson J, Lebeda I, Gazo I, Shaliutina O, Dzyuba B, Linhart O. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 2015; 159: 66-76.

Tedesco P. A, Beauchard O, Bigorne R, Blanchet S, Buisson L, Conti L, Cornu JF, Dias MS, Grenouillet G, Hugueny B, Jézéquel C, Leprieur F, Brosse S, Oberdorff T. Data Descriptor: A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. *Scientific Data*, 2017; 4: 170141.

Varela-Junior AS, Fernandes-Silva E, Figueiredo-Cardoso T, Yokoyama-Namba É, Desessards-Jardim R, Streit-Junior DP, Dahl-Corcini C. The role of dimethyl sulfoxide in the cryopreservation of Curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. *Semina: Ciências Agrárias*, 2015; 36 (5): 3471-3479.

Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009; 35 (1): 137-150.

Volpedo, A, Thompson, GA. Environmental changes on freshwater fish communities *in* South America in the last five decades: a case study in northeast Argentina. *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*, 2017; 4 (3): 47-61.

Watson PF, Fuller BJ. 2001. Principles of Cryopreservation Gametes and Embryos. En: Watson PF, Holt WV (Editores). Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future? Taylor & Francis. London, UK. p. 21-46.

Woelders H, Chaveiro A. Theoretical prediction of "optimal" freezing programmes. *Cryobiology*, 2004; 49 (3): 258-271.

Yasui GS, Fujimoto T, Arias-rodriguez L, Takagi Y, Arai K. The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 2012; 344-349: 147-152.