



Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes¹ *Technologies for fish semen production and storage*

Paulo César Falanghe Carneiro

Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, CEP 49025-040, Brasil
Correspondência: paulo@cpatc.embrapa.br

Resumo

O conhecimento sobre o armazenamento de sêmen de peixe vem avançando desde a década de 50. Neste artigo são apresentadas técnicas de processamento e armazenamento de sêmen de peixes, abordando sua importância como ferramenta tanto para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico quanto para iniciativas de re-estabelecimento de populações em ambientes em recuperação. Informações sobre as particularidades do sêmen das diversas espécies de peixes permitem a padronização da técnica, definindo com isso os componentes dos crioprotetores e meios diluentes, bem como os procedimentos adequados para o congelamento e descongelamento. Avanços nessa área permitem a criação de importantes bancos de sêmen de peixes nativos.

Palavras-chave: criopreservação, espermatozóide, conservação, aquíicultura.

Abstract

The knowledge on fish semen storage has been improved since the beginning of the 1950 decade. This paper presents techniques on fish semen production and storage, indicating its importance as a tool either for aquaculture genetic programs or maintenance of genetic diversity of fish populations that are endangered. Information about particularities on semen of different fish species allow the advance on techniques as cryoprotectants and extenders determinations, as well as adequate procedures and rates for semen freezing and thawing. Improvements in this area are of interest to promote the creation of important gene banks for native fish species.

Keywords: cryopreservation, spermatozoa, conservation, aquaculture

Introdução

O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe foi realizado há mais de 50 anos por Blaxter (1953) para viabilizar o cruzamento de dois “tipos” de arenque que desovam em épocas diferentes do ano. Desde então, muitas são as técnicas de manipulação de sêmen já estabelecidas para várias espécies de peixes, com especial destaque para os ciprinídeos (Billard *et al.*, 1995), os silurídeos (Legendre *et al.*, 1996) e os salmonídeos (Scott e Baynes, 1980). Mesmo assim, com exceção para a truta arco-íris e o salmão do Atlântico, ainda há muitas questões básicas para serem respondidas no tocante às técnicas de conservação de sêmen de muitas espécies tropicais de interesse econômico e ambiental (Carolsfeld *et al.*, 2003a).

Sob refrigeração, os espermatozoides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, enquanto que mantidos em temperaturas negativas podem ser estocados por muitos anos (Billard *et al.*, 2004). A refrigeração do sêmen possibilita sua estocagem por mais de 10 dias para algumas espécies nativas de interesse comercial, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples e de baixo custo que pode ser implementada nas pisciculturas voltadas à produção de alevinos. A técnica de refrigeração possibilita ainda a redução dos custos de manutenção do plantel de reprodutores e trocas de material genético entre laboratórios (Carneiro *et al.*, 2006).

O congelamento do sêmen de peixes com nitrogênio líquido apresenta algumas limitações quanto à sua utilização para a produção de alevinos em larga escala em função da necessidade de armazenamento de grandes volumes de sêmen. Por outro lado, trata-se de uma técnica muito valiosa para a preservação de material genético que pode ser utilizado tanto para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico quanto para programas de preservação de populações nativas com vistas à sua recuperação em ambientes que sofreram degradação. Em ambas as situações a conservação de sêmen por longos períodos tem por finalidade prover a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. Da mesma forma que uma população natural de peixes depende da alta variabilidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio onde vive, um plantel de reprodutores precisa dessa variabilidade para diminuir possíveis

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

efeitos negativos causados por endocruzamentos e hom&ozigoses (Fauvel *et al.*, 1998; Carolsfeld *et al.*, 2003b).

O presente trabalho visa apresentar as técnicas de processamento e armazenémento de sémen de peixes e abordar sua importéncia como ferramenta na conservaçao dos recursos genéticos da ictiofauna bem como sua aplicaçao na aúicultura.

Por que conservar sémen de peixe?

Séo muitas as raz&oes que justificam a importéncia do uso de técnicas para o armazenémento de sémen de peixes, tanto ligadas às quest&oes ambientais quanto econ&omicas. A agress&ao sofrida pelo meio ambiente nos últimos anos, em especial os ambientes aqu&aticos, vem afetando diretamente as populaçoes de esp&ecies nativas de peixes. Mesmo antes de uma esp&ecie de peixe entrar para a lista daquelas ameaçadas de extinçao, muitas de suas caracterésticas genéticas originais podem ter sido modificadas visando a sua adaptaçao ao ambiente alterado. Com o passar de algumas poucas geraçoes, algumas caracterésticas genéticas podem até serem perdidas. As estratégias de recuperaçao da ictiofauna de corpos d'àgua que passam por peréodo de revers&ao de um processo de deterioraçao podem ser grandemente auxiliadas por sémen coletado num peréodo anterior e armazenado sob baixas temperaturas (Rana, 1995).

O tema reveste-se de grande importéncia, principalmente em funçao do not&orio decl&eiacio dos estoques pesqueiros causado pelas mais diversas raz&oes como a sobrepesca, a poluiçao, o uso conflitante da àgua, a construçao de barragens e reservat&orios, o extrativismo, além da introduçao indiscriminada de esp&ecies ex&oticas. Adicionalmente, as mudanças clim&aticas recentemente intensificadas pela emiss&ao de gases na atmosfera certamente ter&ao efeito na perda de algumas populaçoes de peixes que n&ao s&ao adapt&aveis às temperaturas mais quentes das &aguas. A reduçao no n&umero de indiv&duos de uma determinada populaçao reduz também a sua variabilidade genética, fazendo com que sua capacidade de adaptaçao a novos ambientes seja diminu&eiacda. O armazenémento de sémen de peixes por longos peréodos de tempo é uma ferramenta importante que possibilita a manutençao da variabilidade genética de uma populaçao para uso futuro. Sua utilizaçao numa eventual tentativa de recuperaçao de uma populaçao de peixes garante uma base genética mais ampla, produzindo indiv&duos com maior capacidade de adaptaçao e menores chances de sucumbir diante das alteraçoes causadas no meio ambiente (Carolsfeld *et al.*, 2003b).

No tocante à atividade produtiva representada pela piscicultura, hé muitas vantagens no uso de técnicas de conservaçao de sémen de peixes. Ao rever um pouco a hist&oria percebe-se que todas as esp&ecies de animais e plantas tidas hoje como domesticadas passaram por um processo de cruzamentos iniciado e complementado continuamente com a participaçao de esp&ecies silvestres. Os parentes silvestres das raças melhoradas t&em genes necess&arios para o melhoramento continuado das esp&ecies domesticadas de interesse econ&omico. Em v&arios casos eles oferecem genes para os quais n&ao houve previs&ao de seu uso imediato, mas que podem ser importantes para a continuidade da produçao de uma determinada esp&ecie. A manutençao de planteis de reprodutores de peixes com a finalidade de gerar descendentes para a produçao nas pisciculturas depende da constante renovaçao de seus indiv&duos e atençao para se evitar os riscos do endocruzamento. Endocruzamento é o acasalamento entre indiv&duos de parentesco pr&oximo e que leva à hom&ozigose, presen&ca de apenas uma forma do gene para uma caracteréstica particular. A hom&ozigose n&ao é necessariamente um problema, sendo muitos dos caracteres importantes de animais dom&esticos dependentes de caracterésticas hom&ozig&oticas relacionadas a, por exemplo, crescimento e produçao de leite. Porém, a hom&ozigose de formas delet&erias de genes é prejudicial e o endocruzamento tem maior tend&eancia a acumular esta condiçao do que o cruzamento entre indiv&duos sem parentesco (Tave, 1986).

Em aúicultura, problemas de consang&uineidade, por exemplo, podem ocorrer como resultado de cruzamento seletivo que seleciona genes de interesse particular pelo endocruzamento, reduzindo a diversidade genética. A montagem de um banco genético com sémen congelado de peixes é uma forma eficiente de manter o tamanho efetivo da populaçao sem a manutençao de um grande n&umero de reprodutores. O sémen de muitos machos conservado num banco genético pode ser utilizado para a fertilizaçao dos ovos de algumas f&emeas, diminuindo grandemente os riscos do endocruzamento sem a necessidade de manutençao de um grande plantel de reprodutores (Jorstad e Naevdal, 1996).

Em se tratando ainda das pisciculturas, atualmente as técnicas de congelamento de sémen de peixe t&em sido utilizadas de forma mais intensa nos processos de manutençao de planteis de reprodutores. Sua aplicaçao na obtençao de grandes quantidades de alevinos exige o congelamento e a conservaçao de sémen em maiores volumes, o que implica no aperfeiçamento da ténica e na necessidade de espa&cos maiores para o armazenémento. Porém, s&ao ineg&aveis as grandes vantagens que podem ser obtidas com o estoque de sémen para utilizaçao durante os procedimentos de reproduçao induzida em laborat&orio como a reduçao do tamanho do plantel de reprodutores, reduçao dos gastos com horm&onios e melhor atençao às f&emeas durante os preparativos para a desova. Para esse prop&osito, mesmo o uso de técnicas simples de armazenémento de curto prazo sob refrigeraçao pode ser considerada uma ferramenta importante. Sémen de v&arias esp&ecies de peixe apresenta

característica favorável ao uso dessa técnica conferindo aos procedimentos de reprodução induzida as vantagens apresentadas acima (Pepper e Crim, 1996).

Conhecendo melhor o sêmen dos peixes

Apesar das grandes diferenças que o sêmen de algumas espécies de peixes pode apresentar, a maioria das espécies apresenta características em comum, sendo a mais importante delas para o objetivo de armazenamento a ativação da motilidade pela água. Os espermatozoides não apresentam motilidade, isto é, não apresentam movimento quando estão dentro dos testículos. A fertilização dos óvulos somente ocorre após a ativação da motilidade dos espermatozoides que se dará após seu contato com a água. Normalmente a ativação é irreversível e a motilidade tem duração muito curta de tempo, após o qual o espermatozoide fica incapaz de fertilizar o óvulo. As reservas energéticas do espermatozoide são exauridas rapidamente, sendo importante o conhecimento desse tempo para a espécie que está sendo trabalhada. Espermatozoides de salmão e truta nadam vigorosamente por menos de um minuto ao passo que outras espécies como tilápias, dourado e a piracanjuba produzem sêmen que apresentam motilidade de alguns minutos. Algumas espécies tropicais nativas de água doce de interesse econômico como o pintado, o corimbatá, o matrinxã, o piaçu e o pacu apresentam tempo muito curto de motilidade, excedendo pouco mais de um minuto (Marques, 2001).

Durante os procedimentos de desova em laboratório é comum a retirada dos gametas “a seco”, evitando o contato com a água. A adição da água é feita somente após a mistura dos gametas, aumentando com isso as chances dos espermatozoides fertilizarem os óvulos dentro do curto tempo em que permanecem ativos. Para o armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas, portanto, é importante que seu congelamento seja feito sem que ele seja ativado, sendo imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração (Harvey e Carolsfeld, 1993).

Por outro lado, os procedimentos de congelamento necessitam o uso de meios diluentes e agentes protetores, como veremos adiante, sendo geralmente constituídos de soluções aquosas. Contudo esta solução deve ser elaborada de modo a não ativar o sêmen, sendo mais comumente feita a adição de glicose para aumentar a sua pressão osmótica e evitar com isso a ativação do espermatozoide. Na prática o desenvolvimento de uma solução dessas para uma determinada espécie de peixe necessita de ensaios para a avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e sua influência sobre a integridade e funcionalidade espermática. Resumidamente, quando misturado ao meio diluidor, o sêmen não deve estar móvel, mas a sua ativação deve continuar sendo possível com a adição de água no momento da fertilização após o armazenamento e descongelamento (Ohta e Izawa, 1996).

O congelamento e seus efeitos nas células

O congelamento de um tecido ou célula inicia externamente pela formação de gelo. Paralelamente a isso são formadas regiões com elevada concentração de soluto (Senger, 1986) que dá origem a uma exosmose e desidratação necessária da célula (Smirnov, 1976). Quando o congelamento é feito em ritmo adequado, há tempo suficiente para a desidratação da célula e a saída da água, evitando-se com isso a formação de cristais em seu interior. Porém, muitas vezes esse processo não ocorre dessa maneira e há a formação de cristais de gelo intracelulares responsáveis por injúrias irreversíveis na célula. Por outro lado, durante congelamento excessivamente lento, as células são expostas por muito tempo aos chamados “efeitos de solução”, isto é, a todas as características de mudanças da solução extracelular como, a cristalização do gelo, a concentração de sal e elevação da osmolaridade, a alteração do pH, as alterações das composições das soluções em consequência dos sais atingirem seu ponto de saturação e cristalização, além de todas as implicações celulares desses eventos (Senger, 1986; Watson, 1995).

Diferentemente das hemácias, células com alta permeabilidade que possibilita rápida desidratação, o espermatozoide necessita da adição de substâncias com ação crioprotetora para o seu congelamento adequado (Suquet *et al.*, 2000). As substâncias adicionadas para exercer função crioprotetora direta sobre a célula espermática são divididas em crioprotetores intracelulares e extracelulares. O crioprotetor intracelular é uma substância química não tóxica capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo internamente. O produto mais conhecido e utilizado em sêmen de peixe é o dimetilsulfóxido (DMSO), porém outras substâncias como o glicerol e o metanol também têm sido empregadas para algumas espécies (Suquet *et al.*, 2000). Os crioprotetores extracelulares revestem a célula externamente e estabilizam sua membrana, diminuindo os danos provocados pelo congelamento. Além de funcionar como fonte de nutrientes, a gema de ovo também tem ação crioprotetora por conter ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação do espermatozoide (Carolsfeld *et al.*, 2003b).

O descongelamento é um procedimento inverso ao congelamento, porém que merece a mesma atenção. A velocidade de descongelamento do sêmen deve ser tal que permita a re-hidratação celular, mas ao mesmo tempo seja breve o suficiente para evitar que pequenos cristais no interior da célula aumentem seus tamanhos

durante esse processo e prejudiquem a célula. Como há muitas particularidades entre os sêmens das diferentes espécies de peixe, tanto a velocidade e temperatura de congelamento quanto de descongelamento devem ser obtidas pela condução de ensaios experimentais com antecedência para uma determinada espécie pouco estudada (Fauvel *et al.*, 1998; Billard *et al.*, 2004).

A conservação do sêmen

Gelo seco e nitrogênio líquido

O congelamento de células vivas pode ser feito basicamente de duas formas, pelo uso do gelo seco (neve carbônica ou dióxido de carbono sólido) ou do nitrogênio líquido. O gelo seco mantém as células na temperatura -79°C enquanto que o nitrogênio líquido permite a manutenção da temperatura -196°C , sendo esse último o melhor meio para conservação de sêmen de peixe, e de outros animais, por longos períodos de tempo, facilitando inclusive sua identificação e diminuindo o risco de contaminação do material. O congelamento em gelo seco é feito pela colocação de pequenas porções de sêmen diluído, previamente resfriadas, diretamente sobre pequenos poços feitos no bloco de gelo seco, formando os chamados “pelletes” de sêmen. Trata-se de uma metodologia pouco utilizada atualmente, porém que possibilitou a geração de muita informação sobre as particularidades de várias espécies anteriormente ao advento do nitrogênio líquido (Blaxter 1953).

Trabalhar com nitrogênio líquido exige cuidados especiais e o conhecimento de duas de suas propriedades básicas, a baixa temperatura e a alta taxa de expansão. Por estar na forma líquida em -196°C , são necessários recipientes especiais para evitar grandes perdas por evaporação e equipamentos de proteção individual para sua manipulação como luvas e óculos. O fato de expandir-se rapidamente e ocupar volumes muito maiores quando na forma gasosa exige também que o recipiente que vai mantê-lo não seja lacrado totalmente. Nota-se portanto que o transporte de recipientes com nitrogênio líquido, normalmente representados por botijões especiais de diferentes tamanhos possui regulamentações internacionais por tratar de mercadoria perigosa. Atualmente para o transporte são utilizados botijões menores chamados de “dry shippers” que possuem material poroso absorvente na parede para reter o nitrogênio líquido, eliminando com isso o perigo de vazamento (Carolsfeld *et al.*, 2003b).

O congelamento e o descongelamento do sêmen de peixe

Teoricamente a velocidade do metabolismo celular é nula a -196°C e o tempo de armazenamento pode ser ilimitado em condições ideais de estocagem, que inclui basicamente a manutenção adequada do nível do nitrogênio líquido dentro do botijão. Porém, existem inúmeros detalhes importantes que devem ser observados para o sucesso no armazenamento do sêmen por longos períodos, desde a sua incorporação com a solução protetora adequada, seu correto resfriamento anteriormente ao congelamento, seu congelamento propriamente dito e finalmente seu descongelamento e utilização respeitando suas características particulares.

O preparo da solução protetora envolve primeiramente a diluição do crioprotetor intracelular (geralmente DMSO, mas também glicerol ou metanol) em concentrações de 5 a 10% na presença de glicose, geralmente em 5% para aumentar a pressão osmótica da solução e evitar a ativação do espermatozóide. A gema de ovo participa como um crioprotetor extracelular e geralmente é adicionada logo antes do uso da solução. Para espécies de peixes ainda pouco estudadas sugerem-se ensaios prévios envolvendo a observação da motilidade do espermatozóide em microscópio (utilizando-se ativadores como $\text{NaCl} - 0,45\%$ ou $\text{NaHCO}_3 - 1\%$) antes e após sua incorporação à solução protetora. A proporção meio diluidor:sêmen normalmente utilizada está entre 3:1 e 10:1 e varia em função da concentração final requerida para a fertilização. Esta por sua vez leva em conta o número de ovos que se deseja fertilizar com cada dose armazenada individualmente. A forma mais adequada para manipulação dessas doses para o armazenamento envolve o emprego de palhetas plásticas de 0,5 mL que, após o resfriamento, podem ser acondicionadas organizadamente nos botijões de nitrogênio líquido. A organização é importante para se evitar a retirada e possível descongelamento de palhetas adicionais àquela de interesse num determinado momento. Para tanto são feitas identificações individuais nas palhetas que por sua vez são colocadas em “goblets” ou “cassetes” plásticos ou ainda em raques de alumínio e, por fim, armazenadas nas canecas (ou “canisters”) em botijões criobiológicos (Ohta *et al.*, 1997; Carolsfeld *et al.*, 2003b; Billard *et al.*, 2004).

A adição do meio diluidor ao sêmen pode ser feita nos próprios tubos graduados utilizados para a sua coleta, sendo que a homogeneização e envase é facilitada utilizando-se tubos de ensaio de 15 mL. O envase pode ser realizado logo após a diluição à temperatura ambiente ou após a refrigeração. O sêmen geralmente é refrigerado até a temperatura de 5°C em geladeira e em seguida congelado posicionando-se as palhetas em rampas horizontais e expondo-as inicialmente ao vapor e posteriormente à imersão direta no nitrogênio líquido para posterior armazenamento. Atualmente tem sido utilizada com muito sucesso em várias espécies, a automatização do processo de refrigeração e congelamento (ou congelamento) com grandes vantagens na

uniformização e controle de qualidade do sêmen congelado. Muitas dessas etapas podem ser eliminadas ou simplificadas quando for utilizado o “dry shipper” para algumas espécies, introduzindo-se as palhetas diretamente nos botijões. Na vitrificação, técnica ainda em fase de desenvolvimento e expansão na tecnologia de sêmen, são utilizadas altas taxas de resfriamento e aquecimento, fundamentalmente removendo-se anteriormente o máximo possível de água das células através da adição de elevadas concentrações de crioprotetores o que induz a solidificação das células e previne a formação de cristais de gelo intra e extracelulares. De qualquer forma, o procedimento para criopreservação de sêmen deve ser padronizado previamente para cada espécie de peixe para definição da taxa de resfriamento mais adequada (Ohta e Izawa, 1996; Carolsfeld *et al.*, 2003b).

Da mesma forma é importante também a determinação da taxa de descongelamento para uso do sêmen após o período de armazenamento em nitrogênio líquido. O descongelamento do sêmen de espécies tropicais é feito geralmente pela introdução rápida (3-8 segundos) da palheta em água quente (45-60°C). O procedimento de fertilização de ovos que se segue após o descongelamento do sêmen deve ser bem organizado para que o sêmen descongelado seja rapidamente misturado aos óvulos e ativado pela adição de água ou solução ativadora (Billard *et al.*, 2004; Suquet *et al.*, 2000).

Considerações finais

As técnicas de processamento e armazenamento de sêmen de peixes permitem a formação de bancos de genes, ou seja, de locais para estocagem e manutenção permanente de material genético. Os bancos de genes, por exigirem investimentos constantes e prazo indeterminado, devem estar diretamente ligados a esforços voltados a atividades conservacionistas e à cadeia produtiva da piscicultura. Muito já se sabe sobre os procedimentos para armazenamento de sêmen de algumas espécies de peixes, porém ainda há necessidade de estudos adicionais para muitas espécies nativas importantes para programas de recuperação ambiental e outras que apresentam grande potencial de produção em cativeiro. Nesse sentido, considera-se que as técnicas de produção e armazenamento de sêmen de peixes deveriam receber a atenção de um maior número de instituições, empresas e grupos de pesquisadores que, por sua vez, devem unir esforços e compartilhar informações no intuito de otimizar recursos, garantir a integridade genética das coleções e contribuir para a formação de bancos de sêmen de peixes nativos de destaque internacional.

Referências

- Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M.** Sperm physiology and quality. *In: Bromage NR, Roberts, RJ (Ed.). Broodstock management and egg and larval quality.* Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, 1995. p.53-76.
- Billard RJ, Cosson, SB, Noveiri M.** Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, v.236, p.1-9, 2004.
- Blaxter JHS.** Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, v.172, p.1189-1190, 1953.
- Carneiro PCF, Segui MS, Ióris-Filho CR, Mikos JD.** Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Rev Acadêmica*, v.4, n.3, 2006. (no prelo).
- Carolsfeld, J, Harvey B, Baer A, Ross C.** (Eds.). *Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status*, New York: World Bank and Ottawa-IDRC. 215p. 2003a.
- Carolsfeld J, Harvey B, Godinho HP, Zaniboni-Filho E.** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol*, v.63, p.472-481, 2003b.
- Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, Zonno V, Menu B.** Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. *Aquatic Liv Res*, v.11, p.387-394, 1998.
- Harvey B, Carolsfeld J.** *Induced breeding in tropical fish culture.* Ottawa: International Development Research Centre, 1993.
- Jorstad KE, Naevdal G.** Breeding and Genetics. *In: Pennel W, Barton BA, (Ed.). Principles of salmonid culture.* Amsterdam: Elsevier, 1996. p.655-726.
- Legendre M, Linhart O, Billard R.** Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Liv Res*, v.9, p.59-80, 1996.
- Marques, S.** *Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce.* 2001. 98f. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Zoologia, Belo Horizonte, 2001.
- Ohta H, Izawa T.** Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, v.142, p.107-118, 1996.
- Ohta H, Ikeda K, Izawa T.** Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. *J Exp Biol*, v.277, p.171-180, 1997.



- Pepper VA, Crim LW.** Broodstock Management. *In:* Pennel W, Barton BA, (Ed.). *Principles of salmonid culture*. Amsterdam: Elsevier, 1996. p.231-290.
- Rana K.** Preservation of gametes. *In:* Bromage NR, Roberts, RJ (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.88-94.
- Scott AP, Baynes SM.** A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J Fish Biol*, v.17, p.707-739, 1980.
- Senger PL.** Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. *In:* Morrow DA (Ed). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.116-174.
- Smirnov IV.** A theory about deep freezing semen. *In:* International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 8, 1976, Krakow. *Proceedings ...* Krakow: ICAR, 1976. p.333.
- Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R.** Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult Res*, v.31, p.231-243, 2000.
- Tave D.** *Genetics for fish hatchery managers*. Westport, CN: AVI Publishing, 1986.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
-