Documentos

Dezembro, 2012

Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação *ex situ/in vitro* de Sêmen de Peixes

Foto: Alexandre Nizio Maria e Paulo César Falanghe Carneiro

Embrapa

Dezembro, 2012

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos

339 *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*
ISSN 0102-0110

175 *Embrapa Tabuleiros Costeiros*
ISSN 1678-1953

Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação *ex situ/in vitro* de Sêmen de Peixes

Paulo César Falanghe Carneiro
Hymerson Costa Azevedo
Eduardo Gomes Sanches
Alexandre Nizio Maria

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)
Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
Home Page: http://www.cenargen.embrapa.br
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações
Presidente: *João Batista Teixeira*
Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*
Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*
Lucília Helena Marcelino
Lígia Sardinha Fortes
Márcio Martinelli Sanches
Samuel Rezende Paiva
Vânia Cristina Rennó Azevedo
Suplentes: João Batista Tavares da Silva
Daniela Aguiar de Souza Kols

Revisão técnica: Silvia Tereza Ribeiro Castro
Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes
Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães
Foto da capa: Alexandre Nizio Maria e Paulo César Falanghe Carneiro

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação *ex situ/in vitro* de sêmen de peixes. / Paulo César Falanghe Carneiro, Hymerson Costa Azevedo, Eduardo Gomes Sanches e Alexandre Nizio Maria. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2012.
16 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 339; Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, 175).

Revisão técnica: Silvia Tereza Ribeiro Castro

1. Recursos Genéticos – Animal. 2. Conservação *ex situ/in vitro*. I. Carneiro, Paulo César Falanghe. II. Azevedo, Hymerson Costa. III. Sanches, Eduardo Gomes. IV. Maria, Alexandre Nizio. V. Título. VI. Série.

581.15 - CDD

© Embrapa 2012

Autores

Paulo César Falanghe Carneiro
Ph. D. em Zootecnia, Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros
paulo.carneiro@embrapa.br

Hymerson Costa Azevedo
Ph. D. em Medicina Veterinária, Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros
hymerson.azevedo@embrapa.br

Eduardo Gomes Sanches
Ph. D. em Aquicultura, Pesquisador do Instituto de Pesca, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte – Ubatuba, SP

Alexandre Nizio Maria
Ph. D. em Zootecnia, Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros
alexandre.maria@embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas por variabilidade dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação humana.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro
Chefe Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução 08

Descritores 09

Manejo dos peixes para a coleta de sêmen 10

Análises de qualidade do sêmen antes e após o congelamento 10

Meios diluidores e crioprotetores 11

Recipientes para o envasamento de sêmen 11

Congelamento ou criopreservação de sêmen 11

Métodos de descongelamento de sêmen 12

Considerações finais 12

Referências 15

Conservação *ex situ/in vitro* de Sêmen de Peixes

Paulo César Falanghe Carneiro
Hymerson Costa Azevedo
Eduardo Gomes Sanches
Alexandre Nizio Maria

Introdução

A criopreservação é uma técnica que utiliza temperaturas extremamente baixas para manter a estrutura e funcionalidade de células e tecidos vivos, conservando-os estrutural e geneticamente viáveis e temporariamente inativos do ponto de vista metabólico e funcional. Essa técnica apresenta diversas vantagens para a conservação de gametas de peixes em bancos de germoplasma, tanto para ações de preservação de espécies e de restabelecimento de populações em ambientes naturais quanto para programas de manejo reprodutivo e de melhoramento genético.

Apesar de muitos estudos já realizados e muitos outros em andamento sobre a criopreservação de ovócitos e embriões de peixes, ainda não existem protocolos definidos e totalmente validados que garantam o uso eficaz dessa técnica em muitas espécies. Contudo, a criopreservação de espermatozoides de peixes mostra-se como uma técnica viável e relativamente fácil de ser aplicada para a conservação do recurso genético contido nesse material biológico.

As técnicas de criopreservação envolvem o uso do nitrogênio líquido, o que exige cuidados especiais e o conhecimento de duas de suas propriedades básicas: a temperatura e a alta taxa de expansão. Por um lado, a forma líquida a -196°C exige recipientes especiais para evitar grandes perdas por evaporação e equipamentos de proteção individual para sua manipulação, tais como luvas e óculos. Adicionalmente, o fato de se expandir rapidamente e ocupar volumes muito maiores quando na forma gasosa exige, também, que o recipiente que o mantêm não seja totalmente lacrado.

Ressalta-se, portanto, que o transporte de sêmen – por ser realizado usualmente em botijões especiais de diferentes tamanhos e por conter nitrogênio líquido, que é considerado material perigoso – possui regulamentação internacional. Atualmente, são utilizados para o transporte botijões de tamanho pequeno, conhecidos como "dry shippers", que possuem material poroso absorvente entre suas paredes duplas, o qual serve para reter o nitrogênio líquido e liberar apenas vapor em seu interior, eliminando, assim, o perigo de vazamento. Botijões "dry shipper" têm sido utilizados com sucesso, inclusive para o congelamento do sêmen de muitas espécies de peixes.

Teoricamente, a velocidade do metabolismo celular é nula a -196°C. Desse modo, o tempo de armazenamento pode ser ilimitado em condições ideais de estocagem, como a manutenção adequada do nível do nitrogênio líquido dentro do botijão e se realizado o manuseio rápido e cuidadoso do sêmen criopreservado. Existem, ainda, inúmeros detalhes

importantes que devem ser observados para o sucesso no armazenamento do sêmen por longos períodos, desde a sua diluição com a solução protetora adequada, o correto resfriamento anterior ao congelamento propriamente dito e, finalmente, o descongelamento e a utilização.

Atualmente, há protocolos de criopreservação de sêmen definidos para várias espécies de peixes, com especial destaque às famílias *Characidae, Prochilodontidae, Anastomidae, Pimelodidade, Siluridae, Cyprinidae, Salmonidae, Centropomidae, Epinephelidae* e *Lutjanidae*. Porém, com exceção da truta arco-íris e do salmão do Atlântico, ainda há muitas questões básicas a serem respondidas no que diz respeito às técnicas de conservação de sêmen de várias espécies tropicais nativas de interesse econômico e ambiental.

O presente manual apresenta um resumo das informações sobre a conservação *ex situ/in vitro* de sêmen de peixes, com especial destaque às técnicas de criopreservação.

Descritores

Guardar e organizar toda a informação que acompanha as alíquotas de sêmen que serão armazenadas é tão importante quanto conhecer a técnica de criopreservação. O conjunto de informações básicas que identificam o material biológico que será conservado é chamado de descritores. No Brasil, a conservação *ex situ/in vitro* é uma atividade relativamente nova quando se trata de peixes e, para estes animais, ainda não estão completamente definidos os descritores mínimos que devem acompanhar o material biológico a ser armazenado. Porém, após discussões recentes com especialistas dessa área no país, foi elaborada uma lista com sugestões de descritores (Tabela 1).

O sêmen estocado num banco de germoplasma deve ter seus descritores documentados em planilha eletrônica e em banco de dados informatizado. A identificação do animal doador por meio de análise molecular é informação importante que também deve ser registrada. Para que a análise seja realizada, deve-se coletar um pequeno pedaço da nadadeira (aprox. 1-2 cm^2) que pode ser conservado em tubo plástico de 1,5 mL, contendo etanol 95%, e mantido sob temperatura ambiente previamente à análise.

Tabela 1. Descritores sugeridos para a conservação *ex situ/in vitro* de sêmen de peixes.

Descritores mínimos		Descritores complementares
Nome científico e vulgar da espécie	Protocolo de criopreservação utilizado (diluidor, proporção sêmen vs meio diluidor/crioprotetor, curva de congelamento e tipo de envase)	Concentração espermática do sêmen fresco *in natura* Motilidade espermática do sêmen descongelado
Identificação do local de coleta (coordenadas geográficas, nome do corpo d'água, bacia hidrográfica , local de cultivo)	Local (instituição, propriedade ou outra localidade) onde foi feito o congelamento/armazenamento	Morfologia espermática Temperatura, pH e salinidade da água
Caracterização da origem (espécie nativa ou exótica do local de coleta)	Foto do doador	
Data de coleta	Volume de sêmen coletado	
Data de congelamento	Número de doses armazenadas	
Comprimento total e padrão	Motilidade espermática do sêmen fresco *in natura*	
Peso		

Manejo dos peixes para a coleta de sêmen

É fundamental o conhecimento do ciclo reprodutivo da espécie que será submetida à coleta, pois muitas espécies apenas liberam sêmen durante um período específico do ano, que pode compreender poucas semanas ou meses. Em se tratando de coleta no ambiente natural (rios, lagos, mangues, ambientes costeiros ou recifais, etc.), os preparativos são mais complexos, pois muitos procedimentos são realizados dentro de uma embarcação ou às margens de um corpo d'água. Ademais, muitos dos animais podem não estar fisiologicamente maduros para liberar sêmen em quantidade e qualidade adequadas para ser congelado.

O trabalho é facilitado quando a coleta é realizada em peixes de um plantel de reprodutores em uma piscicultura. No caso de espécies reofílicas, ou seja, aquelas que dependem do processo migratório para finalizar sua maturação gonadal, há a necessidade de indução hormonal prévia para facilitar a coleta de sêmen em maior quantidade. Esses procedimentos e os tipos de hormônios utilizados variam de espécie para espécie, porém há muita informação disponível para várias das espécies de peixes nativos de interesse comercial e ambiental.

Em todos os casos, para a coleta de sêmen, o macho deve ser retirado da água e ter a região abdominal limpa e seca com papel toalha. O abdome deve ser massageado no sentido crânio-caudal e o sêmen coletado em tubos de vidro ou seringas, evitando qualquer contato com a água (Figura 1). Quando o volume de sêmen é grande (> 5 mL), deve-se recolher o ejaculado em dois ou três recipientes para evitar contaminação da amostra com urina, fezes ou sangue. Ocorrendo contaminação a alíquota deve ser descartada. Os tubos ou seringas com o material colhido devem ser colocados em uma caixa de isopor com gelo, evitando-se sempre o contato direto do gelo com o recipiente que contém o sêmen.

Análises de qualidade do sêmen antes e após o congelamento

A qualidade seminal pode ser avaliada em microscópio com aumento de 400x de acordo com a motilidade e viabilidade espermáticas. Antes das avaliações, coloca-se uma gota de sêmen em uma lâmina de vidro para confirmar que os espermatozoides estão imóveis e que não houve contaminação. Qualquer movimento sugere contaminação, e a amostra deve ser descartada. Para a avaliação da motilidade, ativa-se o movimento espermático por meio da adição de cinco gotas de bicarbonato a 1,0% ou 35% à gota do sêmen de peixes de água doce ou salgada, respectivamente. A avaliação da motilidade deve ser realizada de forma subjetiva. A motilidade pode ser subjetivamente medida de forma percentual (0 a 100%) ou com um escore arbitrário (1 = intensidade de batimento de flagelo muito lento a 5 = natação rápida). Apenas amostras de sêmen fresco *in natura* com pelo menos 70% das células em movimento ou escore entre 4 e 5 têm sido recomendadas para criopreservação.

A avaliação da viabilidade espermática é feita com corante a base de eosina-nigrosina, que diferencia as células viáveis das não viáveis. Para tanto, deve-se colocar uma gota de sêmen e duas gotas do corante, separadas, em uma lâmina de vidro. Após a mistura do sêmen ao corante, deve-se fazer um esfregaço com outra lâmina de vidro, completando toda a operação em, no máximo, um minuto. A leitura da lâmina corada é feita em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Os espermatozoides não viáveis

coram-se de vermelho-róseo, enquanto que os viáveis permanecem não corados. Para cada amostra, devem ser contadas cerca de trezentas células. Recomenda-se que somente amostras de sêmen com pelo menos 70% de células viáveis devem ser utilizadas para a criopreservação.

Meios diluidores e crioprotetores

O preparo do meio envolve, primeiramente, a diluição de um ou mais crioprotetores, a exemplo do dimetilsulfóxido (DMSO) e metilglicol (éter metílico do etilenoglicol), em concentrações de 5 a 10%. A solução deve conter glicose para aumentar a sua osmolaridade e, com isso, evitar a ativação do espermatozoide. Gema de ovo também é comumente utilizada como integrante da solução crioprotetora, em concentrações que variam entre 5 a 10%. No caso de peixes de água salgada ou estuarina, torna-se necessária a utilização de diluidores com composição química adequada à espécie e a adição de DMSO, também em concentração de 5 a 10%. Para algumas espécies nativas, já existem informações publicadas sobre protocolos de criopreservação mais adequados; porém, para espécies de peixes ainda pouco estudadas, sugerem-se ensaios prévios envolvendo a observação da motilidade e viabilidade espermática, antes e após a diluição do sêmen à solução crioprotetora.

Recipientes para o envasamento de sêmen

São várias as opções de recipientes utilizados para envasar sêmen de peixes, tais como tubos ou palhetas plásticas e ampolas de vidro. As várias formas e materiais resultam em diferentes propriedades de transferência de calor durante o congelamento e o descongelamento. Mesmo entre recipientes de mesmo modelo, mas de diferentes fabricantes, podem existir variações na taxa de congelamento e descongelamento. Portanto, é necessário padronizar o método de congelamento adequado para o recipiente que será utilizado, a fim de garantir que os protocolos sejam replicados de forma similar em distintos laboratórios.

A forma mais utilizada para o envasamento do sêmen é o emprego de palhetas plásticas de 0,5 mL, que podem ser facilmente organizadas em botijões criogênicos. Esse tipo de recipiente apresenta uma série de vantagens, como: enchimento e vedação manual ou automatizado; identificação individual da amostra com uso de canetas de ponta fina; impressão de rótulos alfanuméricos e código de barras; facilidade de transporte, racionalização de espaço e padronização de todo o processo.

A organização no armazenamento é importante para evitar a retirada e o possível descongelamento equivocado de amostras. Para tanto, além da identificação individual das palhetas, estas são colocadas em *globetes* ou cassetes plásticos; ou, ainda, em raques de alumínio e, por fim, armazenadas em canecas (ou *canisters*) dentro dos botijões com nitrogênio líquido.

Congelamento ou criopreservação de sêmen

A adição da solução crioprotetora ao sêmen deve ser realizada suavemente e pode ser feita nos próprios tubos graduados utilizados para a coleta, sendo que a homogeneização e o envasamento são facilitados com a utilização de tubos de ensaio de 15 mL. A proporção

sêmen:diluidor normalmente utilizada está entre 1:3 e 1:10, e o envasamento pode ser realizado logo após a diluição. Em peixes marinhos, os melhores resultados têm sido obtidos com proporções entre 1:1 e 1:3.

Em geral, as doses de sêmen podem ser refrigeradas, inicialmente, até a temperatura média de 5°C, em gelo ou em geladeira. Em seguida, o sêmen deve ser congelado, posicionando-se as palhetas em bandejas horizontais expostas ao vapor de nitrogênio líquido para, posteriormente, serem imersas no nitrogênio líquido, onde ficarão armazenadas. Atualmente, o "dry shipper" tem sido utilizado para o congelamento do sêmen de muitas espécies tropicais, introduzindo-se as palhetas contendo o sêmen diluído diretamente nesse tipo de botijão, sem a necessidade do uso do vapor de nitrogênio líquido. De qualquer forma, o procedimento para criopreservação de sêmen deve ser previamente padronizado, a fim de que sejam definidas as taxas de resfriamento e congelamento mais adequadas para cada espécie de peixe.

Métodos de descongelamento de sêmen

É importante, também, a determinação da taxa de descongelamento do sêmen armazenado em nitrogênio líquido. As doses congeladas em palhetas de 0,5 mL devem ser imersas rapidamente em água quente (de 3 a 8 segundos, sob temperatura de 45 a 60°C) para que o sêmen seja descongelado uniformemente. O descongelamento torna-se mais difícil com macropalhetas ou criotubos maiores, porque o processo pode não ser uniforme, ou seja, os espermatozoides localizados na superfície descongelam mais rapidamente do que aqueles na porção central, o que demanda ajustes na temperatura e/ou no tempo de descongelamento. O procedimento de fertilização que se segue após o descongelamento deve ser bem organizado para que os espermatozoides sejam rapidamente misturados aos ovócitos, e os espermatozoides pela adição de água ou solução ativadora.

Considerações finais

As informações contidas neste manual são generalizadas, considerando resultados de trabalhos científicos com muitas espécies de peixes. Sua utilização visa orientar trabalhos que busquem a definição de protocolos mais adequados para cada espécie, buscando o desenvolvimento de metodologias de criopreservação do sêmen como ferramenta de conservação *ex situ/in vitro* de recursos genéticos de peixes.

Fotos: Alexandre Nizio Maria e Paulo César Falanghe Carneiro

Figura 1. Ilustração do roteiro utilizado durante a coleta, processamento, congelamento e descongelamento de sêmen de peixes até o momento da sua mistura com ovócitos para fertilização. (**A**) Indução hormonal. (**B**-**C**) Coleta do sêmen dos machos em frascos limpos e secos. (**D**) Manutenção do sêmen sob refrigeração (4-6°C) até o processamento das amostras para o congelamento. (**E**) Verificação da qualidade do sêmen em microscópio. (**F**) Diluição do sêmen na solução crioprotetora. (**G**) Palhetas e criotubos para criopreservação do sêmen. (**H**) Congelamento do sêmen em bandejas horizontais. (**I**) Congelamento do sêmen em "dry shipper". (**J**) Transferência e armazenamento das doses de sêmen em botijões com nitrogênio líquido. (**K**) Descongelamento em banho-maria. (**L**) Adição de sêmen descongelado a ovócitos para fertilização.

Anexo. Lista de materiais utilizados na conservação *ex situ/in vitro* de recursos genéticos de peixes.

Procedimento	Materiais	Função
Indução hormonal	Extrato de hipófise de carpa (EHC), LH-RHa	Hidratação testicular para facilitar a espermiação e coleta do sêmen
	Cadinho e pistilo	Maceração do EHC
	Solução fisiológica 0,9%	Veículo para aplicação do EHC e do LH-RHa
	Seringa e agulha	Aplicação intramuscular ou intraperitoneal do EHC ou do LH-RHa
	Puçá	Captura e contenção do peixe
Coleta e envasamento do sêmen	Anestésico (eugenol, benzocaína)	Manipulação dos peixes
	Papel toalha	Secagem das áreas adjacentes ao poro urogenital
	Tubos de vidro ou seringas	Recipientes para coleta do sêmen
	Caixa de isopor com gelo	Manutenção do sêmen refrigerado
Avaliação do sêmen	Solução de eosina-nigrosina	Avaliação da viabilidade espermática
	Solução de bicarbonato de sódio a 1,0% ou água salgada (35‰)	Ativação da motilidade espermática
	Microscópio e lâminas	Avaliação a motilidade e viabilidade espermática
Congelamento do sêmen (criopreservação)	Solução glicosada a 5% estéril (Glicose 5%)	Diluição do sêmen
	Gema de ovo	
	DMSO (dimetilsulfóxido), metanol, metilglicol (Éter metílico do etilenoglicol).	
	Diluente para sêmen de peixes marinhos	
	Palhetas de 0,5 mL ou criotubos, tubos de vidro, béquer e proveta	Preparo e mistura das soluções de congelamento e diluição e envasamento de sêmen
	Álcool polivinílico, esferas metálicas ou seladores térmicos	Fechamento das palhetas ou criotubos com sêmen
	Nitrogênio líquido (N_2L)	Congelamento e armazenamento do sêmen
	Botijão de vapor de N_2L (“dry shipper”)	
	Botijão criobiológico	
	Pinça, luvas	
Descongelamento do sêmen	Banho-maria com água aquecida 45 a 60°C	Descongelamento das palhetas ou criotubos
	Tesoura, papel toalha e recipiente de vidro ou plástico	Retirada do sêmen descongelado das palhetas

Referências

BLAXTER J. H. S. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, v. 172, p. 1189-1190, 1953.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. **Methods in reproductive aquaculture. Marine and freshwater species.** CRC Press. 568 p.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1/2, p. 361-366, 2007.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura**. In: Tavares-Dias, M.. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1ª ed. Amapá: Embrapa Amapá, 2009, v. 1, p. 47- 63.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, p. 1-5, 2011.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779-783, 2010.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). **Methods in molecular biology**: Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2th ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2007.

SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. da R.; SERRALHEIRO, P. C. da S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Bioikos**, v. 22, p. 81-90, 2008.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, p. 293-305, 2010.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1673-1680, 2011.

TIBA, R. M.; OLIVEIRA, I. da R.; SERRALHEIRO, P. C. S.; OSTINI, S. Diluentes e proporções sêmen: diluente na crioconservação do sêmen do robalo-peva *Centropomus parallelus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 99-110, 2009.

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL BRASIL PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA