

## UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE PEIXES

*(Use of anti-freezing proteins in seminal fish cryopreservation)*

Yasmim Maia FERREIRA; José Ferreira NUNES; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY\*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE).  
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 –Campus do Itaperi, Fortaleza, CE. CEP: 60.740-000.

\*E-mail: [sandra.salmito@uece.br](mailto:sandra.salmito@uece.br)

### RESUMO

A criopreservação seminal é uma das biotécnicas reprodutivas mais promissoras para a aquicultura, pois permite o transporte de gametas, garante melhorias genéticas em espécies desejadas e minimiza a assincronia entre machos e fêmeas reprodutores. Apesar dos benefícios, danos celulares podem ser ocasionados durante o processo de congelamento, causando a diminuição da qualidade dos espermatozoides. Sendo assim, estudos que busquem alternativas que minimizem tais danos são de grande importância. As proteínas anticongelantes (AFPs) são importantes compostos originados a partir de processos evolutivos em organismos que vivem em ambientes polares. As AFPs podem ser utilizadas como possíveis agentes crioprotetores, pois são capazes de diminuir os cristais de gelo e proteger a membrana plasmática das células durante o processo de congelamento. Dessa forma, esta revisão tem como objetivo reunir informações acerca da utilização de proteínas anticongelantes na conservação do sêmen de peixes e apresentar os principais resultados encontrados na literatura. Observou-se que a utilização dessas substâncias na criopreservação seminal em peixes promoveu melhorias nas taxas de motilidade espermática, velocidades e integridade de membrana plasmática. Tais melhorias foram observadas de maneira interespecífica. Portanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados com intuito de verificar o efeito das AFPs na capacidade de fertilização, buscando a melhor opção para suplementação do meio.

**Palavras-chave:** Reprodução, sêmen, teleosteo, AFP.

### ABSTRACT

Seminal cryopreservation is one of the most promising reproductive biotechniques for aquaculture, as it allows the transport of gametes, ensures genetic improvements in desired species and minimizes asynchrony between breeding males and females. Despite the benefits, cell damage can be caused during the freezing process, causing decreased quality of sperm. Therefore, studies that seek alternatives that minimize such damage are of great importance. Antifreeze proteins (AFPs) are important compounds originated from evolutionary processes in organisms that live in polar environments. AFPs can be used as possible cryoprotective agents, as they are able to decrease ice crystals and protect the plasma membrane of cells during the freezing process. Thus, this review aims to gather information about the use of antifreeze proteins in the conservation of fish semen and present the main results found in the literature. It was observed that the use of these substances in seminal cryopreservation in fish promoted improvements in the rates of sperm motility, velocities and integrity of the plasma membrane. Such improvements were observed in an interspecific manner. Therefore, further studies are needed in order to verify the effect of AFPs on fertilization capacity, seeking the best option for supplementing the medium.

**Key words:** Reproduction, sperm, teleost, AFP.

### INTRODUÇÃO

A congelamento de sêmen tornou-se um importante componente da tecnologia de reprodução assistida, pois permite a preservação do material genético ao longo das gerações e facilita a reprodução artificial independentemente do período natural de desova (Cabrita *et al.*, 2010). Apesar dos benefícios desta técnica de conservação, ainda há a perda da viabilidade espermática em decorrência de danos celulares, dificultando a consolidação de bancos

genéticos para uso em larga escala. O processo de criopreservação de espermatozoides envolve mudanças extremas de temperatura que provocam lesões criogênicas irreversíveis na morfologia, estrutura e fisiologia celular, levando ao comprometimento da motilidade e resultando na perda da capacidade de fertilização (GWO; ARNOLD, 1992; LAHNSTEINER *et al.*, 1996; LINHART *et al.*, 2000; ZILLI *et al.*, 2003; HE; WOODS, 2004; FIGUEROA *et al.*, 2016).

Para a criopreservação do sêmen, faz-se necessária a adição de uma solução diluidora composta por diluente(s) e crioprotetor(es) responsáveis por manter a viabilidade da célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelação e descongelação seminal (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012). Estudos em ascensão mostram que o uso de proteínas anticongelantes (AFP) na solução de criopreservação ajuda a manter a composição lipídica da membrana plasmática e estabiliza os espermatozoides, reduzindo as alterações induzidas pelo congelamento no padrão proteico (SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ *et al.*, 2019; ZILLI *et al.*, 2014; BEIRÃO *et al.*, 2012; FIGUEROA *et al.*, 2017,2018; MAGNOTTI *et al.*, 2018).

As AFPs são proteínas encontradas em peixes, bactérias, fungos, insetos e plantas que vivem em ambientes com baixas temperaturas (EWART *et al.*, 1998). Tais proteínas podem fornecer proteção às células, diminuindo o ponto de congelação, modificando o processo de formação de cristais de gelo, evitando a recristalização e interagindo com as membranas plasmáticas em baixas temperaturas (ROBLES *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2017). A capacidade das AFPs de proteger os espermatozoides durante o procedimento de congelação-descongelação foi testada em mamíferos com resultados positivos e negativos (PAYNE *et al.*, 1994; PRATHALINGAM *et al.*, 2006). Alguns estudos foram conduzidos avaliando os possíveis efeitos do uso de AFPs na criopreservação seminal de peixes, indicando que AFPs contribuem para a proteção do metabolismo dos espermatozoides e mantém a estabilização dos lipídios e proteínas da membrana plasmática durante a criopreservação (BEIRÃO *et al.*, 2012; ZILLI *et al.*, 2014; ABED-ELMDOUST *et al.*, 2017).

Esta revisão, portanto, objetiva contemplar as funções das proteínas anticongelantes na conservação do sêmen de peixes e apresentar os principais resultados encontrados na literatura.

## CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

A congelação de sêmen consiste na conservação dos gametas masculinos por meio de congelação utilizando nitrogênio líquido, que está normalmente a uma temperatura de -196 °C. Essa biotecnologia mantém a estrutura e a funcionalidade dos espermatozoides conservadas, mantendo-os inativos e viáveis por tempo indeterminado (CAROLSFELD *et al.*, 2003). Essa técnica permite atingir objetivos como o fornecimento de subsídios para a formação de bancos de gamoplasma, a troca de material genético entre pisciculturas, a disponibilidade de sêmen durante épocas não convencionais, a viabilidade de eventuais programas de hibridização e o transporte de material genético através de longas distâncias com baixo custo e maior segurança (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009; CABRITA *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2012).

Existem dois tipos de criopreservação seminal, forma lenta (método convencional) ou de forma rápida (vitrificação) (MERINO *et al.*, 2012; CUEVAS-URIBE *et al.*, 2011; FIGUEROA *et al.*, 2015). Na congelação lenta são utilizadas baixas concentrações de crioprotetores, sendo necessário haver um tempo de equilíbrio antes da congelação. Dessa forma, se faz necessária a utilização de equipamentos como isopor, *dryshipper* ou máquinas de congelação programáveis. Já na vitrificação, não é preciso tempo de equilíbrio nem uso de equipamentos sofisticados, pois a amostra é depositada imediatamente sobre o nitrogênio líquido.

### **Meios de congelação**

O diluente geralmente é composto por sais e/ou carboidratos que atuam como fonte de energia para o espermatozoide pós-descongelado, além de promover o aumento do volume de sêmen. Para isso, um diluente adequado deve ser isotônico, estável, estéril, ter condutividade térmica elevada, e servir de carreador de crioprotetores (LEGENDRE e BILLARD, 1980). Possuem baixo peso molecular e alta solubilidade em água, e atuam desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior da célula, dificultando a formação de cristais de gelo intracelulares.

Os crioprotetores, por sua vez, devem possuir baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água e são classificados como penetrante (ação interna) ou não-penetrante (ação externa) (BATISTA *et al.*, 2006). Possuem alto peso molecular e agem aumentando a osmolaridade do espaço extracelular, levando à desidratação da célula durante a congelação, e evitando um aumento excessivo da osmolaridade durante a descongelação, além de recobrir a superfície da célula, estabilizando a membrana (BAKHACH, 2009; CUEVAS-URIBE e TIERSCH, 2011; WATSON, 1995).

### **Proteínas anticongelantes (AFPs)**

As AFPs são proteínas inicialmente encontradas e caracterizadas em peixes teleósteos do continente Antártico (DEVRIES-AL e WOHLISCHLAG, 1969). Por seleção natural, tais organismos desenvolveram soluções diferenciadas para lidar com climas extremamente frios. O surgimento de um gene de proteína anticongelante foi uma das soluções mais importantes. Desde suas descobertas em peixes, diversos tipos de AFPs foram também identificados em espécies de bactérias, fungos, insetos e plantas (XIANG *et al.*, 2020).

As AFPs possuem afinidade por cristais de gelo devido à complementaridade estrutural encontrada entre os domínios proteicos e as superfícies das estruturas cristalinas. A ligação das proteínas a estas superfícies proporciona efeitos protetivos em relação aos danos que o congelamento causa às células e, como consequência, apresenta dois efeitos práticos: a histerese térmica (TH, do inglês, *thermalhysteresis*) e a inibição da recristalização (RI, do inglês, *recrystallizationinhibition*). Ambos os efeitos são extremamente importantes para a sobrevivência e a manutenção das atividades metabólicas de organismos que possuem a capacidade de sobreviver em condições extremas de baixas temperaturas (XIANG *et al.*, 2020; JOHN *et al.*, 2009).

### **Histerese térmica (TH)**

A prevenção da congelação é uma estratégia de sobrevivência que evita que os fluidos corporais de teleosteos marinhos congelem em temperaturas muito abaixo de 0°C, de modo que sobrevivam à estação fria (DOLEV *et al.*, 2016). A diferença de temperatura entre o ponto de fusão e o ponto de congelação é chamada de histerese térmica (TH) (KNIGHT, 2000). Os cristais de gelo contêm dois planos distintos em suas estruturas chamados de plano basal e plano prisma. O crescimento e a expansão dos cristais de gelo devem-se à associação de novas moléculas de água nestes planos e podem acontecer em direção aos eixos denominados de A (sentido horizontal) e C (sentido vertical) (SULIS, 2015).

Na ausência de AFPs, o crescimento e a expansão dos cristais ocorrem mais rapidamente no plano prisma (em direção ao eixo-A), formando uma estrutura cristalina mais larga e em forma de disco (GUPTA *et al.*, 2014). A adsorção de AFPs ocorre em planos específicos das superfícies de cristais de gelo. Preferencialmente ocorre no plano prisma e, assim, impede a associação das demais moléculas de água neste plano e, logo, o crescimento e a expansão dos cristais ao longo do eixo-A é interrompido. Portanto, as AFPs conseguem alternar as características morfológicas dos cristais circular e achatado para hexágono-bipiramidal (XIANG *et al.*, 2020; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

### **Inibição da recristalização (IRI)**

Uma propriedade importante para organismos tolerantes à congelação é a inibição da recristalização de cristais de gelo. Grandes cristais de gelo têm menor energia livre e são mais termodinamicamente estáveis do que pequenos cristais de gelo; assim, os grandes cristais de gelo crescem enquanto pequenos cristais que encolhem (XIANG *et al.*, 2020). As ligações de AFPs impedem a associação entre pequenos cristais de gelo, evitando a formação de grandes cristais nos ambientes celulares e extracelulares. Geralmente, quanto maior a atividade IRI de um AFP, menores são os cristais de gelo que podem se formar (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013; SULIS, 2015).

### **Estrutura das AFPs**

Diversos tipos de estruturas já foram identificados em AFPs. Em peixes, estas proteínas variam em massa molecular (3 a 33 kDa) e estruturas secundárias, podendo adquirir conformações com predominância de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e estruturas desordenadas. As AFPs de peixes são classificadas em cinco tipos, nomeados de: AFGPs; AFP-I; AFP-II; AFP-III; AFP-IV (MIDDLETON *et al.*, 2012; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). As AFGPs contêm de 4 a 50 sequências repetidas em tandem dos resíduos de aminoácidos alanina-alanina-treonina com um dissacarídeo ligado em cada extremidade hidroxila dos resíduos de treonina. As AFPs-I são caracterizadas por conter regiões ricas em resíduos de alanina e predominância de estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélices. As AFPs-II são proteínas ricas em pontes de dissulfeto e contém regiões mistas entre as estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ . Além disto, as AFPs desta classe são estruturalmente globulares. As AFPs-III são ricas em curtas estruturas de folhas- $\beta$ , e as AFP-IV são proteínas com feixes helicoidais e ricas em resíduos de alanina (KANDASWAMY *et al.*, 2011; GRAETHER *et al.*, 2000).

### AFPs na congelação seminal de peixes

Com relação à aplicação de biotécnicas reprodutivas para a reprodução de peixes, a criopreservação ainda precisa superar a falta de padronização de metodologias e procedimentos. A adição de determinados compostos poderia melhorar a qualidade dos espermatozoides pós-descongelação, protegendo as células contra o estresse oxidativo (peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, fragmentação de DNA, proteção enzimática), parâmetros que têm importância nas pesquisas (CABRITA *et al.*, 2010).

Em peixes, a utilização de AFPs nos meios de congelação seminal tem apresentado resultados promissores na qualidade do sêmen pós-descongelado das seguintes espécies: *Cyprinus carpio*, *Acipenser ruthenus*, *A. persicus* e *Sparus aurata* (Quad. 01). Pode-se observar que características do sêmen variam entre espécies, dentro de amostras de um mesmo animal, dependendo do período de coleta e até mesmo durante a estação reprodutiva. Dessa forma, o estudo da qualidade seminal de diferentes espécies e o desenvolvimento de ferramentas para caracterizá-la deve ser prioridade (CABRITA *et al.*, 2010).

**Quadro 01:** Principais resultados na criopreservação do sêmen de peixes utilizando proteínas anticongelantes (APFs).

Espécie	Método de conservação	AFP	Concentração	Motilidade (%)	Autores
<i>Acipenser persicus</i>	Vitrificação	AFP III	10µM	16,11±0,5	Abed-Elmdoust <i>et al.</i> (2015)
<i>Acipenser ruthenus</i>	Criopreservação	AFP I	10µg/mL	56±20	Xin <i>et al.</i> (2018)
<i>Cyprinus carpio</i>	Criopreservação	AFP III	1µg/mL	~ 70	Shaliutina-Kolešová <i>et al.</i> (2019)
<i>Sparus aurata</i>	Criopreservação	AFP III	1µg/mL	41±11	Beirão <i>et al.</i> (2014); Zilli <i>et al.</i> (2014)

A utilização de AFP III na solução de vitrificação de *A. persicus* obteve motilidade pós-descongelação de 16,11% (ABED-ELMDOUST *et al.*, 2015). É importante salientar que, no procedimento de vitrificação (congelação rápida), as células são imersas diretamente em nitrogênio líquido (MERINO *et al.*, 2012). Estudos acerca dessa biotécnica em peixes ainda são iniciais, não havendo protocolos já determinados.

Para *C. carpio*, a suplementação do meio criodiluyente com AFP III na concentração de 1µg/mL apresentou bons resultados de motilidade espermática (SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ *et al.*, 2019). A motilidade e velocidade dos espermatozoides é o padrão básico para avaliação da qualidade do sêmen criopreservado (LAHNSTEINER *et al.*, 2000). Com o processo de congelação, é natural ocorrer a diminuição dos valores das variáveis de motilidade dos espermatozoides (BORYSHPOLETS *et al.*, 2017). Assim como observado para *A. ruthenus*, os espermatozoides criopreservados com 10µg/mL de AFP I não apresentaram diferenças entre as outras concentrações analisadas: 0,1; 1 e 100µg/mL (XIN *et al.*, 2018).

Em *Sparus aurata*, concluiu-se que a AFPIII na concentração de 1µg/mL atua na proteção de proteínas e na composição de lipídios de membrana, flagelo e cabeça dos

espermatozoides durante o procedimento de congelação-descongelação, garantindo sua estabilidade (ZILLI *et al.*, 2014; BEIRÃO *et al.*, 2014). Além disso, AFPs, especialmente AFP III, têm a capacidade de neutralizar o aumento nas proporções de ácidos graxos saturados que ocorrem durante a criopreservação e interagir preferencialmente com ácidos graxos insaturados (TOMCZAK *et al.*, 2002).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de as biotécnicas reprodutivas aplicadas à reprodução de peixes, como a criopreservação seminal, estarem avançando e contribuindo para os programas de reprodução, verifica-se que ainda existem alguns aspectos considerados críticos à viabilidade das células espermáticas. Além do mais, não há padronização nos protocolos de criopreservação.

Dessa forma, pesquisas reiteram que a adição de AFPs ao meio de congelação seminal proporcionam melhorias espermáticas no pós-descongelação, aumentando as taxas de espermatozoides móveis, velocidades e mantendo a integridade da membrana plasmática. No entanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados com intuito de verificar o efeito das AFPs na capacidade de fertilização, buscando a melhor opção para suplementação do meio.

### REFERÊNCIAS

- ABED-ELMDOUST, A.; FARAHMAND, H.; AMIRI, B.M.; RAFIEE, G.; RAHIMI, R. Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquaculture Research*, v.46, n.10 p.2392-2397, 2015.
- BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of diferente type of tissues. *Organogenesis*, v.5, n.3, p.119–126, 2009.
- BATISTA, M.; ALAMO, D.; GONZALEZ, F.; CRUZ, M.G.; GRACIA, A. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultra-freezer of -152 degrees and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, n.5, p.423-428, 2006.
- BEIRÃO, J.; ZILLI, L.; VILELLA, S.; CABRITA, E.; SCHIAVONE, R.; HERRÁEZ, M.P. Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids *Biology of Reproduction*, v.86, n.2, p.1–9, 2012.
- BORYSHPOLETS, S.; SOCHOROVA, D.; RODINA, M.; LINHART, O.; DZYUBA, B. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio L.*) sperm: impact of seeding and freezing rates on post-thaw outputs. *Biopreservation and Biobanking*, v.15, n.3, p.234–240, 2017.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MÁRTINEZ-PARAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PEREZ-CEREZALES, S.; HERRAEZ, M.P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, v.26, n.5, p.623-635, 2010.



CAPICCIOTTI, C.J.; DOSHI, M.; BEN, R.N. Ice recrystallization inhibitors: From biological antifreezes to small molecules. In: WILSON, P. Recent Developments in the study of recrystallization. 1<sup>a</sup> ed., Ottawa: Intech, p.177-224, 2013.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.31, n.3, p.361-366, 2007.

CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; MARIA, A.N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. Cryoletters, v.33, n.5, p.285- 393, 2012.

CUEVAS-URIBE, R.; TIERSCH, T.R. Non-Equilibrium vitrification: an introduction and review of studies done in fish. In: TIERSCH, T.R.; GREEN, C.C. Cryopreservation in Aquatic Species, 2<sup>a</sup> ed., World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, p.309–324, 2011.

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

DEVRIES, A.L.; WOHLSCHLAG, D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes, Science (New York, N.Y.), v.163, n.3871, p.1073–1075, 1969.

DOLEV, M.B.; BRASLAVSKY, I.; DAVIES, P.L. Ice-binding proteins and their function, Annual review of biochemistry. v.85, n.1, p.515–542, 2016.

EWART, K.V.; LIN, Q.; HEW, C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. Cellular and Molecular Life Sciences, v.55, n.2, p.271-283, 1999.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; NAVARRO, R.D.; GONÇALVES, A.C.S.; PAULINO, M. S. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). Archivos de zootecnia, Córdoba, v.60, n.232, p.1255-1262, 2011.

FIGUEROA, E.; FARIAS, J.G.; LEE-ESTEVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; RISOPATRÓN, J.; MAGNOTTI, C.; ROMERO, J.; WATANABE, I.; OLIVEIRA, R.P. Sperm cryopreservation with supplementation of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, v.493, n.1, p.1–8, 2018.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J.G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. Aquaculture research, v.47, n.6, p.1691–1705, 2016.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; ZEPEDA, A.B.; FIGUEROA, C.A.; DUMORNE, K.; CASTILLO, R.L.; FARIAS, J.G. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. Reviews in Aquaculture, v.9, n.1, p.76-87, 2017.

GRAETHER, S.P.; KUIPER, M.J.; GAGNE, S.M.; WALKER, V.K.; JIA, Z.; SYKES, B.D.; DAVIES, P.L. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. Nature, v.406, n.6793, p.325-328, 2000.

GUPTA, R.; DESWAL, R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. *Journal of Biosciences*, v.39, n.5, p.931-944, 2014.

GWO, J.C.; ARNOLD, C.R. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *Journal of Experimental Zoology*, v.264, n.4, p.444-453, 1992.

HE, S.; WOODS, I.L.C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass *Morone saxatilis* sperm. *Cryobiology*, v.48, n.3, p.254-262, 2004.

KANDASWAMY, K.K.; CHOU, K.C.; MARTINETZ, T.; MOLLER, S.; SUGANTHAN, P.N.; SRIDHARAN, S.; PUGALENTHI, G. AFP-Pred: A random forest approach for predicting antifreeze proteins from sequence-derived properties. *Journal of Theoretical Biology*, v.270, n.1, p.56-62, 2011.

KIM, H.J.; LEE, J.H.; HUR, Y.B.; LEE, C.W.; PARK, S.H.; KOO, B.W. Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Mar Drugs*, v.15, n.2, p.27, 2017.

KNIGHT, C.A. Adding to the antifreeze agenda. *Nature*, v.406, n.6793, p.249-251, 2000.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *The progressive Fish-Culturist*, v.58, n.3, p.149-159, 1996.

LAHNSTEINER, F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. *Aquaculture Research*, v.31, n.3, p.245-258, 2000.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Development*, v.20, n.6, p.1859-1868, 1980.

LEITE, L.V. Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). 2011. 72p. (Mestrado em Reprodução Animal). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

LINHART, O.; RODINA, M.; COSSON, J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, v.41, n.3, p.241-250, 2000.

MAGNOTTI, C.; CERQUEIRA, V.; LEE-ESTEVEZ, M.; FARIAS, J.G.; VALDEBENITO, I.; FIGUEROA, E. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*, v.10, n.1, p.15-25, 2018.

MARIA, N.A.; 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. Amapá: Embrapa Amapá, v.1, p.47-63, 2009.

MERINO, O.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J.; ISACHENKO, E.; KATKOV, I.I.; FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; MALLMANN, K.; ISACHENKO, V. Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. *Andrologia*. v.44, n.1, p.390-395, 2012.



MIMS, S.D.; TSVETKOVA, L.I.; BROWN, G.G.; GOMELSKY, B.I. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. Cryopreservation in Aquatic Species (ed. by R.T. TIERSCH; P.M. MAZIK). World Aquaculture Society, Baton Rouge, p.7, n.1, p.123-129, 2000.

NASCIMENTO, A.F.; MARIA, N.A.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.M.; VIVEIROS, A.T.M. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). Animal Reproduction Science, v.118, n.2-4, p.324-329, 2010.

PAYNE, S.R.; OLIVER, J.E.; UPRETI, G.C. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. Cryobiology, v.31, n.2, p.180-184, 1994.

PRATHALINGAM, N.S.; HOLT, W.V.; REVELL, S.G.; MIRCZUK, S.; FLECK, R.A.; WATSON, P.F. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. Theriogenology, v.66, n.8, p.1894-1900, 2006.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M.P. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: toxicity and protein distribution. Aquaculture, v.261, n.4, p.1299-1306, 2006.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; VIEIRA, M.J.A.F.; LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E.; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. Ciência animal, v.22, n.1, p.255-268, 2012.

SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A.; GAZO, I.; COSSON, J.; LINHART, O. Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. Czech journal of Animal Science, v.58, n.7, p.313-320, 2013.

SULIS, D.B. Sequências nucleotídicas potencialmente capazes de conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento em plantas. 2015. 69p. (Trabalho de conclusão de curso - Biotecnologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

TOMCZAK, M.M.; HINCHA, D.K.; ESTRADA, S.D.; WOLKERS, W.F.; CROWE, L.M. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. Biophysical Journal, v.82, n.2, p.874-881, 2002.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VIVEIROS, A.T.D.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiology and Biochemistry, v.35, n.1, p.137-150, 2009.

VIVEIROS, A.T.D.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H.; ISAÚ, Z.A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilodus (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. Theriogenology, v.74, n.4, p.551-556, 2010.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

XIANG, H.; YANG, X.; KE, L.; HU, Y. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins. *International journal of biological macromolecules*, v.153, n.1, p.661-675, 2020.

XIN, M.; TUČKOVÁ, V.; RODINA, M.; KHOLODNYY, V.; DADRAS, H.; BORYSHPOLETS, S.; LINHART, O. Effects of antifreeze proteins on cryopreserved sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm motility variables and fertilization capacity. *Animal reproduction science*, v.196, p.143-149, 2018.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; STORELLI, C.; VILELLA, S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* v.47, n.3, p.227–235, 2003.

ZILLI, L.; BEIRÃO, J.; SCHIAVONE, R.; HERRAEZ, M.P.; GNONI, A.; VILELLA, S. Comparative proteome analysis of cryopreserved flagella and head plasma membrane proteins from sea bream spermatozoa: effect of antifreeze proteins. *PLoS One*, v.9, n.6, p.1-10, 2014.