

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

MÔNICA ALINE PARENTE MELO

**ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-104) ADICIONADA DE
CRIOPROTETORES SOBRE A MORFOMETRIA DA CABEÇA DE
ESPERMATOZÓIDES DE PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*)
PÓS-DESCONGELAMENTO**

FORTALEZA

2010

MÔNICA ALINE PARENTE MELO

ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-104) ADICIONADA DE
CRIOPROTETORES SOBRE A MORFOMETRIA DA CABEÇA DE
ESPERMATOZÓIDES DE PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*)
PÓS-DESCONGELAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoro e Aves

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

FORTALEZA

2010

M528a	<p>Melo, Mônica Aline Parente Água de coco em pó (ACP-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozóides de pirapitinga (<i>Piaractus brachypomus</i>) pós-descongelamento/Mônica Aline Parente Melo – Fortaleza, 2010. Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes Dissertação de Mestrado (Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros e Aves) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.</p> <p>1. Peixe. 2. Sêmen. 3. Análise Seminal Auxiliada por Computador.</p> <p>CDD: 636.0824</p>
-------	---

MÔNICA ALINE PARENTE MELO

ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP[®]-104) ADICIONADA DE
CRIOPROTETORES SOBRE A MORFOMETRIA DA CABEÇA DE
ESPERMATOZÓIDES DE PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*)
PÓS-DESCONGELAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Profa Dra Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora

Profa Dra Ana Cláudia Nascimento Campos
Universidade Federal do Ceará

Dra Cristiane Clemente de Melo Salgueiro
ACP Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - PPGCV, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pelo apoio financeiro.

Ao Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), da Universidade Estadual do Ceará (UECE) que através do uso de suas instalações e equipamentos, tornou possível a conclusão do experimento.

Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) que disponibilizou os animais e as instalações para realização do experimento.

Á Deus, por ter me dado o bem mais precioso que é a vida, além de força de vontade, iluminação, “saúde”, paciência e determinação para enfrentar todas as dificuldades impostas pela vida.

Ao meu pai José Heldes de Melo Sobrinho, as minhas irmãs, Nádia Nanci Carneiro Melo e Juliana Parente Melo e, principalmente, a minha mãe, **Maria Rosinete Carneiro Parente**, pela educação, incentivo e apoio incondicionais que me deram.

A minha madrinha Francisca Edileuda Gomes Feitosa, por sempre ter acreditado no meu potencial.

Ao Professor Dr José Ferreira Nunes, pela orientação e conhecimentos passados durante os dois anos do Mestrado

A Dra Cristiane Clemente de Mello Salgueiro pelo apoio durante estes dois últimos anos, mas principalmente no início, quando tudo foi muito difícil.

A Dra Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley pela co-orientação, paciência, confiança, apoio desde a graduação.

Ao Professor Dr. Cláudio Cabral Campello, pela realização da estatística, paciência, dedicação e atenção ao projeto.

Ao Alexandre e ao Agenor pela colaboração na execução dos experimentos.

As mestrandas Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira e Liliane Veras Leite que estiveram comigo durante todo o período do mestrado me ajudando com as aulas, experimentos, protocolos, escrita da dissertação, pela amizade e carinho, por terem me ensinado a ser mais paciente, compreensiva, e por estarem presente comigo nos momentos em que eu mais precisei.

Aos alunos de iniciação científica que foram essenciais a realização dos meus experimentos Felipe Silva Maciel, Júlia Trugílio Lopes, Francisco Renan Aragão Linhares, Sérvulo Pinheiro Maia Filho.

Aos alunos de iniciação científica que não participaram dos meus experimentos, mas estavam prontos para ajudar no que fosse necessário, João Paulo Pinheiro, Larissa Teixeira Nunes, Jordana Leite Sampaio.

Aos “três porquinhos” Míriam Luzia Martins Nogueira de Sousa, Nathalie Omundessen Pessoa e Sarah Ramos pelas horas de diversão e trabalho.

A Audália Marques Carvalho e ao Marcelo Ascensão pelos conhecimentos passados.

Aos integrantes do Núcleo Integrado de Biotecnologia, em especial a Iraci Clemente de Melo, a Márcia Helena Sobral, ao José Gonzaga Júnior e a cabrita Bárbara Mara Santas pelo companheirismo.

À Regiane Rodrigues dos Santos, Juliana Jales de Hollanda Celestino e ao Cláudio Afonso Pinho Lopes por serem exemplos de pesquisadores, terem me mostrado o caminho da pesquisa científica e, principalmente, pela nossa amizade.

Aos meus amigos de faculdade Magda Marinho Braga, Orleânicio Gomes Ripardo, Pedro Almeida Pereira, Allan Rodrigo pela amizade, companheirismo, viagens, festas, cinemas, filmes lá em casa, que foram fundamentais para a conclusão do nosso curso de Ciências Biológicas e que nos mantêm unidos até hoje.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação de diluentes e crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozóides de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento em relação ao sêmen fresco. Trinta machos de Pirapitinga foram hipofisados 14 horas antes da coleta do sêmen. Uma alíquota de cada amostra seminal válida foi fixada para análise da morfometria e o restante constituiu o *pool* que foi dividido em três partes. A primeira parte foi criopreservada em ACP-104 ou Ringer adicionados de 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) ou 10% de Metilglicol (MG), com taxa de diluição de 1:4 ou 1:6 (sêmen:diluyente) e acondicionadas em palhetas francesas de 0,5 mL. A segunda, juntamente com as amostras individuais de cada animal, foi fixada para posterior análise morfométrica. A terceira foi transportada ao laboratório em isopor a 4°C para análises de motilidade objetiva pós-ativação. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software *Sperm Class Analyzer*. Após 45 dias, as palhetas foram descongeladas e os espermatozóides foram avaliados em relação à motilidade e morfometria. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e a motilidade foi comparada através do teste de Kruskal-Wallis. Os dados morfométricos foram comparados entre os tratamentos através do teste SNK e com o controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$), sendo expressos em média e desvio padrão. Após a descongelamento, todos os tratamentos apresentaram motilidade significativamente inferior ao controle, e as amostras criopreservadas com ACP-104 apresentaram motilidade significativamente superior às amostras criopreservadas com Ringer. Em relação à morfometria da cabeça dos espermatozóides frescos, estes apresentaram comprimento de $3,3784 \pm 0,132 \mu\text{m}$, largura $2,3391 \pm 0,075 \mu\text{m}$, área $7,3130 \pm 0,386 \mu\text{m}^2$, perímetro $9,7249 \pm 0,332 \mu\text{m}$, alongação $0,1843 \pm 0,018$, elipticidade $1,4592 \pm 0,055$, regularidade $0,8536 \pm 0,009$ e rugosidade $0,9589 \pm 0,027$. Após a criopreservação, não foi observada influência da taxa de diluição utilizada em nenhum dos parâmetros avaliados, além disso, as amostras criopreservadas com Ringer apresentaram área, perímetro, largura e comprimento similares ao controle. Também não houve diferenças significativas dos efeitos testados sobre as variáveis regularidade e rugosidade ($p > 0,05$). As amostras criopreservadas com ACP-104 apresentaram medidas significativamente superiores de comprimento e perímetro que as criopreservadas com Ringer. Com relação à largura e conseqüentemente à área, as amostras criopreservadas com ACP-104

apresentaram medidas significativamente superiores ao controle e às amostras criopreservadas com Ringer. Houve uma redução significativa da elipticidade e alongação em todos os tratamentos pós-descongelção em relação ao controle. Além disso, as amostras criopreservadas com ACP-104 apresentaram uma redução significativa desses dois parâmetros em relação às amostras criopreservadas com Ringer. Conclui-se que, diante de uma melhor motilidade espermática e maior alteração de cabeça pós-descongelção, provavelmente, a criopreservação com ACP-104 tornou os espermatozóides mais adaptados a sobreviver em condições desfavoráveis. Esse trabalho foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará) com protocolo número 09230730-2.

Palavras-chave: Peixe. Sêmen. Análise Seminal Auxiliada por Computador.

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the association of extenders and cryoprotectants on the sperm head morphometry of Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after thawing compared to fresh semen. Thirty Pirapitinga males were hypophysectomized 14 hours before semen collection. One aliquot of each seminal sample valid was fixed for morphometric analysis and the remainder formed the pool which was divided into three parts. The first part was frozen in PCW-104 or Ringer added 10% of Dimethyl sulfoxide (DMSO) or 10% of methylglycol (MG) with a dilution rate of 1:4 or 1:6 (semen: extender) and filled into 0.50 mL straws. The second, together with individual samples from each animal, was fixed for subsequent morphometric analysis. The third was transported to the laboratory in styrofoam at 4 ° C for analysis of objective motility post-activation. All analysis was carried out using the software Sperm Class Analyzer. After 45 days, the straws were thawed and sperm were assessed for motility and morphology. The data were submitted to ANOVA and motility was compared using the Kruskal-Wallis. Morphometric data were compared between treatments using the SNK test and the control by Dunnett test ($p < 0.05$), expressed as mean and standard deviation. After thawing, all treatments had significantly lower motility compared to the control, and the samples preserved in PCW-104 had significantly higher motility compared to those preserved in Ringer ($p < 0.05$). Related to sperm head morphometry of fresh semen, the means values were: length $3.3784 \pm 0.132 \mu\text{m}$, width $0.075 \pm 2.3391 \mu\text{m}$, area $0.386 \pm 7.3130 \mu\text{m}^2$, perimeter $9.7249 \pm 0.332 \mu\text{m}$, elongation 0.1843 ± 0.018 , ellipticity 0.055 ± 1.4592 , regularity 0.8536 ± 0.009 and roughness 0.9589 ± 0.027 . After cryopreservation, there was no influence of dilution rate used in any of the parameters evaluated, in addition, the samples preserved in Ringer showed area, perimeter, length and width similar to control. There were also no significant differences in the effects on the variables regularity and roughness ($p > 0.05$). The samples cryopreserved in PCW-104 had significantly higher measures of length and perimeter that preserved in Ringer ($p < 0.05$). Respect to the width and consequently the area, samples cryopreserved in PCW-104 were significantly superior to the control measures and to the samples preserved in Ringer ($p < 0.05$). There was a significant reduction in the ellipticity and elongation in all treatments after thawing as compared to control ($p < 0.05$). In addition, samples cryopreserved in PCW-104 showed a significant reduction of these two

parameters compared to samples preserved in Ringer ($p < 0.05$). It can be concluded that, with a better sperm motility and greatest change in head after thawing, probably, cryopreservation in PCW-104 made the sperm more adapted to survive in unfavorable conditions. This study was approved by CEUA (Ethics Committee for Animal Use of the Ceará State University) with protocol number 09230730-2.

Keywords: Fish. Semen. Computer-assisted Semen Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pirapitinga (<i>Piaractus brachypomus</i>)	16
Figura 2 - Hipofisação e coleta de sêmen de pirapitinga	17
Figura 3 - Análise da motilidade espermática auxiliada por computador (CASA) de sêmen de pirapitinga	20
Figura 4 - Análise morfométrica da cabeça dos espermatozóides antes (A) e após (B) digitalização pelo programa de análise da morfologia espermática auxiliada por computador (ASMA). 40x.	21
Figura 5 - Equipamento para criopreservação: <i>Dry shipper</i>	23
Figura 6 - Água de Coco em Pó	25
Figure 1: Morphometric analysis of head sperm of pirapitinga post-thaw before and after scanning by the program. (1) PCW-104 + DMSO, 1:4. (2) PCW-104 + MG, 1:4. (3) Ringer + DMSO, 1:4. (4) Ringer + MG, 1:4. (5) PCW-104 + DMSO, 1:6. (6) PCW-104 + MG, 1:6. (7) Ringer + DMSO, 1:6. (8) Ringer + MG, 1:6... 40x.	42

LISTA DE TABELAS

Table 1: Average weight of males and fresh semen characteristics of pirapitinga (n = 30) collected in October 2009 and January 2010.....	40
Table 2: Percentage of total sperm motility in fresh semen of pirapitinga (control) and frozen in PCW-104 or Ringer added Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methylglycol (MG), with dilution rates of 1:4 or 1:6.....	41
Table 3: Width (μm) from pirapitinga sperm head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104 or Ringer added Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methylglycol (MG).....	43
Table 4: Area, length and perimeter of spermatozoa head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104 or Ringer.....	44
Table 5: Ellipticity of spermatozoa head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104 or Ringer.....	44
Table 6: Elongation of spermatozoa head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104 or Ringer added Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methylglycol (MG).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: Água de Coco em Pó

ANOVA: Análise de Variância

ASMA: Análise da morfologia espermática auxiliada por computador

BTS®: Beltsville Thawing Solution

CASA: Análise da motilidade espermática auxiliada por computador

CEUA: Comitê de Ética para o Uso de Animais

CPAq: Centro de Pesquisas em Aquicultura

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNOCS: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas

EHC: Extrato de Hipófise de Carpa

MG: Metilglicol

mM: milimolar

NIB: Núcleo Integrado de Biotecnologia

SCA®: Sperm Class Analyser

SNK: Student-Newman-Keuls

UECE: Universidade Estadual do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Espécie	17
2.2 Taxonomia (FISHBASE, 2008)	18
2.3 Reprodução	18
2.4 Características gerais do sêmen de peixe	19
2.4.1 Motilidade espermática	19
2.4.2 Avaliação da motilidade espermática	20
2.4.3 Morfometria espermática	21
2.5 Criopreservação	22
2.5.1 Processo de criopreservação	23
2.5.2 Crioprotetores e diluentes de congelamento	24
2.5.3 Diluente à base de água de coco em pó	25
2.5.4 Danos causados pela criopreservação	26
3 JUSTIFICATIVA	28
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	29
5 OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo Geral	30
5.2 Objetivos Específicos	30
6 CAPÍTULO 1	31
7 CONCLUSÃO	53
8 PERSPECTIVAS	54
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as populações naturais de peixes têm diminuído devido à degradação ambiental e à pesca excessiva, os quais precipitam a descaracterização e o desaparecimento do habitat aquático natural e dos organismos que nele vivem (MILIORINI, 2006). Com o passar dos anos a demanda de pescado vem aumentando impulsionada principalmente pelo crescimento da população, e a tendência mundial da procura de alimentos saudáveis indicados para a saúde humana, como o pescado, sendo este uma alternativa alimentar de alto valor nutritivo, baixo teor de gordura e alta digestibilidade (ANDRADE; YUSI, 2003).

Embora seja endêmica do Amazonas, a espécie *Piaractus brachypomus* (pirapintiga ou pacu branco), pertencente aos characídeos, é um peixe altamente comercial na região Nordeste brasileira pela qualidade de sua carne. Recentemente, a diminuição na diversidade genética observada nos plantéis de reprodutores das granjas dedicadas à produção de alevinos e os frequentes fenômenos cíclicos de secas, os quais exercem acentuada ação sobre seus processos reprodutivos, obriga a regularização ou desenvolvimento de tecnologias que permitam o intercâmbio de material seminal entre os produtores, aproveitamento de gametas que possam obter-se de indivíduos silvestres e conservação de amostras seminais nos períodos menos favoráveis (FARIAS, 1998; FRESNEDA et al., 2004).

As técnicas de congelamento têm sido utilizadas no controle da reprodução assistida de muitas espécies de interesse econômico (BILLARD et al., 1995), na formação de bancos de sêmen de espécies ameaçadas de extinção (HARVEY, 1996) e na manutenção da variabilidade genética nas pisciculturas (MC ANDREW et al., 1993). Conhecimentos básicos, nesta área, são cada vez mais solicitados, principalmente em função da necessidade de se ter cada vez mais sêmen criopreservado de boa qualidade (SHIMODA, 2004) dessa forma, a aplicação desta técnica em peixes está em amplo desenvolvimento (MURGAS et al., 2007). No entanto, vários aspectos da morfologia dos espermatozoides são afetados pelos danos causados às células durante a criopreservação. A progressiva desidratação das células espermáticas durante o processo de criopreservação (ENGLAND, 1993), a perda da funcionalidade da membrana (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006) e mudanças na estrutura da cromatina espermática (ROYERE et al., 1988) são possíveis explicações para alterações nas dimensões

morfométricas das células espermáticas após a criopreservação. A diminuição na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais tem sido correlacionada com a diminuição da fertilidade tanto de homens como de outros animais (SEKONI & GUSTAFFSSON, 1987).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécie

A Pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), é um peixe migratório, de hábitos onívoros, originário das Bacias do rio Amazonas e Orinoco. Essa espécie pode alcançar até 20 kg de peso e comprimento de aproximadamente 55 centímetros (ALCÂNTARA et al., 1990). É uma espécie rústica, de rápido crescimento, carne de grande aceitação no mercado e excelentes condições para a piscicultura (FRESNEDA et al., 2004) e de grande importância econômica para cultivo em escala comercial na Colômbia, Brasil, Peru, Venezuela e América Central (VÁSQUEZ-TORRES et al., 2002). Segundo MESA & BOTERO (2007), as pirapitingas são espécies de grande importância comercial devido a seu excelente crescimento, resistência ao manejo em cativeiro, alta docilidade, resistência às enfermidades, é de fácil adaptação às condições limnológicas desfavoráveis por períodos não prolongados e porque podem ser criadas com outras espécies, tais como as tilápias e as carpas.



Figura 1 - Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*)

2.2 Taxonomia (FISHBASE, 2008)

Reino Animália

Filo Chordata

Classe Teleostei

Ordem Cypriniforme

Família Characidae

Gênero *Piaractus* (Holmberg, 1887)

Espécie *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818)

2.3 Reprodução

As fêmeas de Pirapitinga alcançam sua maturidade sexual ao cabo de três anos, enquanto que nos machos ocorre ao final de dois anos. São espécies de fecundação externa que liberam seus gametas no meio ambiente. Nas condições naturais, estes peixes migram rio acima no período entre junho/julho até outubro, quando os ovários das fêmeas ainda não estão desenvolvidos, por isso são chamadas de espécies de piracema. A desova ocorre no período de novembro a fevereiro quando as condições ambientais se tornam ideais, com temperatura média da água de 27°C, após as primeiras chuvas (VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008).

Em tanques de piscicultura, esta migração fica impossibilitada e a reprodução apenas é viável mediante a utilização de técnicas de indução hormonal, como a hipofisação. A técnica de hipofisação consiste na aplicação de hormônios oriundos da hipófise de peixes doadores ou produzidos industrialmente (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983).

Os machos dessa espécie produzem sêmen o ano todo e a coleta do sêmen é possível após a indução hormonal. No entanto, as fêmeas são mais sensíveis as estações do ano e, algumas vezes, não respondem à indução hormonal. Quando respondem, os ovócitos produzidos são de má qualidade e as taxas de fertilização são insatisfatórias (NASCIMENTO et al., 2010).

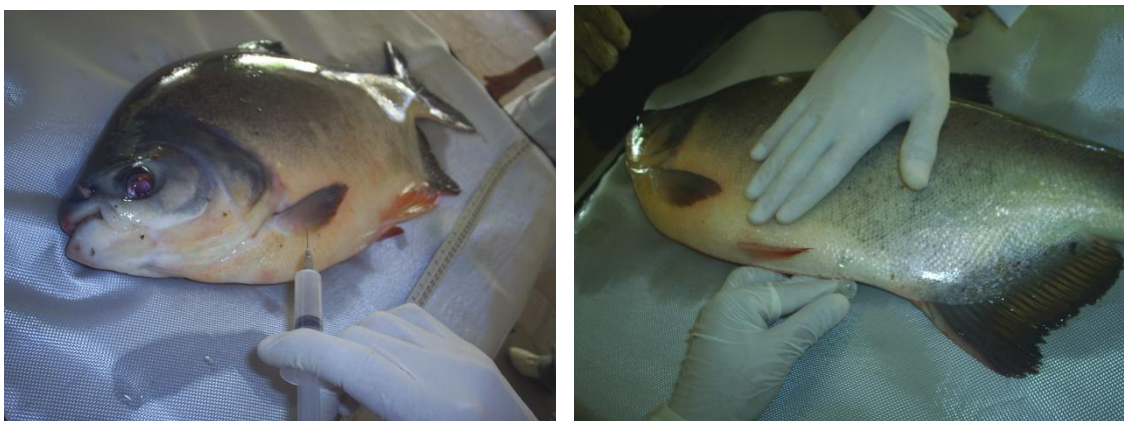


Figura 2 - Hipofisação e coleta de sêmen de pirapitinga

2.4 Características gerais do sêmen de peixe

Os espermatozoides da maioria dos peixes não possuem acrossoma, característica que os diferencia do sêmen de mamíferos. Não precisam desta estrutura

porque os gametas, ao serem liberados no meio, entram diretamente na micrópila dos ovócitos, finalizando a fecundação. Esta cavidade permanece pouco tempo aberta, se fechando em poucos minutos ao hidratar-se no momento em que entra em contato com a água, por ocasião da desova (MORALES, 1986). Segundo BILLARD et al. (1980), o vigor dos espermatozóides é um parâmetro importante para ser correlacionado com a fertilização, já que a micrópila dos óvulos abre-se rapidamente, permanecendo aberta por apenas alguns segundos, possibilitando aos espermatozóides com maior motilidade penetrarem e provocarem, assim, maiores taxas de fertilização.

A produção espermática de peixes é muito alta, devido ao grande número de divisões spermatogoniais (BILLARD, 1990a) e muito variada. Em algumas espécies o macho produz 100 bilhões de espermatozóides/ano/kg do peso corporal ou mais de 1×10^9 espermatozóides/g de testículo/dia, o que é 10 vezes maior do que a produção relatada para mamíferos (BILLARD, 1990b)

2.4.1 Motilidade espermática

Os espermatozóides de peixes se encontram inativos dentro dos testículos. Ao entrar em contato com a água, contam com um breve período de ativação, que se expressa no movimento e velocidade para lograr a fertilização. Esta motilidade se deve a mudanças na pressão osmótica, balanço iônico e pH do meio em que se encontram. O fluido seminal não só imobiliza os espermatozóides, como também oferece proteção (COSSON et al., 1999). Quando ocorre a espermiacção no meio aquoso, os fatores que suprimem a motilidade são neutralizados, no momento, pelas condições do meio ambiente e a motilidade espermática é parcialmente controlada pela pressão osmótica.

Em peixes continentais, a água tem uma baixa osmolaridade em comparação com o plasma seminal, ocorrendo assim um choque hiposmótico que gera o sinal inicial para os eventos que conduzem à ativação e que, na maioria dos peixes de água doce, tem uma duração de 30 a 40 segundos não sendo relatada na literatura tempo de sobrevivência superior à uma hora em espécies de fecundação externa (BILLARD et al., 1980; HINES & YASHOUV, 1971). Com uma solução ativadora de qualquer composição iônica, entre 100 e 200 miliosmoles (mOsm/kg), já é possível desencadear a ativação espermática (VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008). Já foram validados como ativadores de sêmen de peixe o bicarbonato de sódio 1% para piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (MURGAS et al., 1998), água de coco *in natura* entre 125 e 150mM para

tambaqui (*Colossoma macropomum*) (FARIAS et al., 1999), bicarbonato de sódio 119mM para curimba (*Prochilodus lineatus*) (MURGAS et al., 2007), 0,29% de NaCl para pirapitinga (NASCIMENTO et al., 2010) entre outros. O pH extracelular é outro fator que controla os parâmetros da motilidade, e seus valores ótimos são necessários, mas não suficientes, para as condições de ativação espermática. Alterações do pH interno (um possível segundo mensageiro celular) interferem na motilidade em diferentes espécies (TABARES et al., 2005).

2.4.2 Avaliação da motilidade espermática

A análise espermática computadorizada tem se desenvolvido e está continuamente sendo aperfeiçoada desde que foi introduzida no início dos anos 80 (AMANN & HAMMERSTEDT, 1980). Usualmente, a qualidade do sêmen é apenas avaliada através da estimativa da porcentagem de espermatozóides móveis. Alguns trabalhos avaliam de forma mais detalhada a atividade espermática, apresentando a velocidade dos espermatozóides e a frequência de batimento flagelar, medido mediante análise de vídeo-micrografia. O analisador de motilidade espermática assistida por computador, Sperm Class Analyser (SCA), tem sido amplamente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de aves e mamíferos, sendo a sua aplicação recente em estudos nos peixes (RURANGWA et al., 2001). Com o auxílio do programa é possível identificar espermatozóides parados (amarelo) com velocidade lenta (azul), média (verde) e rápida (vermelha) (Figura 3).

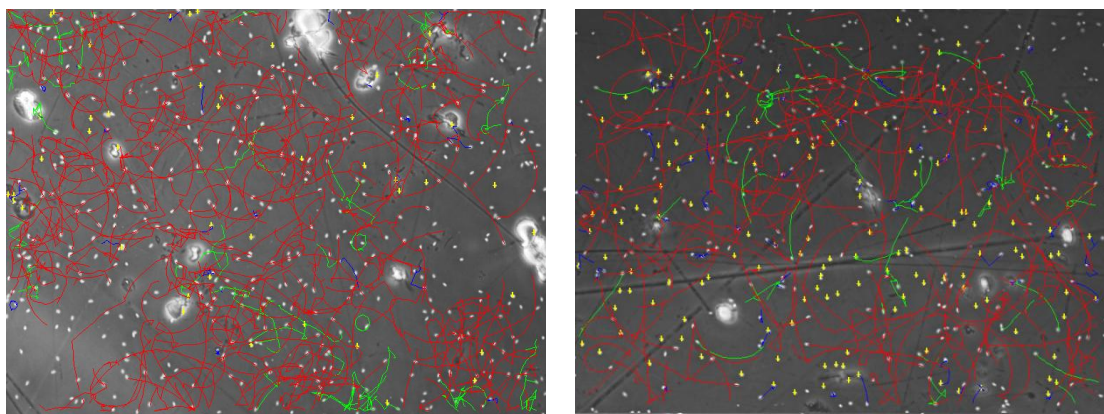


Figura 3 - Análise da motilidade espermática auxiliada por computador (CASA) de sêmen de pirapitinga.

2.4.3 Morfometria espermática

Técnicas convencionais de avaliação têm sido utilizadas para avaliação subjetiva dos parâmetros seminais como a motilidade, morfologia, volume e concentração do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002). Há muitos anos a morfologia espermática tem sido avaliada de forma subjetiva utilizando a observação visual ao microscópio, o que deu origem a variações entre os resultados obtidos por diferentes técnicos e laboratórios (OMBELET et al., 1997). Estudos anteriores têm descrito a ultraestrutura de espermatozoides de peixe e examinado sua morfologia através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (TADDEI et al., 2001). Embora a microscopia eletrônica seja uma ferramenta para avaliação das estruturas morfológicas por fornecer informações detalhadas, seu uso não é prático, pois não permite uma rápida avaliação de um grande número de espermatozoides. Além disso, a microscopia eletrônica requer reagentes e equipamentos mais caros e um maior tempo é necessário para realização das análises (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2008).

Assim, a busca por métodos que tenham acurácia, objetividade e repetibilidade na avaliação da fertilidade espermática continua sendo o objetivo de diversos estudos. A introdução do sistema de análise da morfometria espermática assistida por computador (ASMA) tentou superar o problema da subjetividade dos métodos de avaliação visual, pois é totalmente automatizado.

A avaliação das dimensões e conformação geral dos espermatozoides se faz necessária, pois, já foi demonstrado que uma pobre morfologia seminal é um indicador importante da diminuição da fertilidade em caprinos (CHANDLER et al., 1988), equinos (VOSS et al., 1981), bovinos (SEKONI & GUSTAFSSON, 1987) e humanos (KRUGER et al., 1988).

A análise da morfometria espermática assistida por computador foi desenvolvida inicialmente para avaliação do sêmen humano (DE MONSERRAT et al., 1995) e tem sido progressivamente adaptada a outras espécies mamíferas (GRAVANCE et al., 1996) demonstrando níveis altos de precisão e confiança (VERSTEGEN et al., 2002). Em peixes, a ASMA foi utilizada para descrever mudanças na forma dos espermatozoides da enguia européia causada pela indução hormonal da espermição (ASTURIANO et al., 2006) e observados efeitos da taxa de diluição, crioprotetores utilizados e suplementação do meio de criopreservação (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006b), uma vez que crioprotetores e protocolos de criopreservação são conhecidos por causar danos a

morfologia dos espermatozoides (BILLARD, 1983). MARCO-JIMÉNEZ et al. (2008), trabalhando com sargo bicudo (*Diplodus puntazzo*) e sargo cabeça-dourada (*Sparus aurata*) mostraram que a mensuração morfométrica da cabeças dos espermatozoides utilizando o ASMA foi similar as mensurações obtidas utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

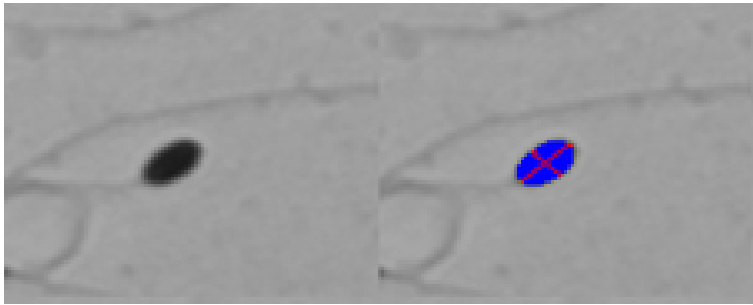


Figura 4 - Análise morfométrica da cabeça dos espermatozoides antes (A) e após (B) digitalização pelo programa de análise da morfologia espermática auxiliada por computador (ASMA). 40x.

2.5 Criopreservação

A criopreservação de sêmen é uma importante técnica na aquicultura e tem facilitado os procedimentos de reprodução assistida. Com o sêmen criopreservado, é necessário apenas trabalhar com as fêmeas na indução da desova e coleta dos ovócitos. O sêmen congelado pode ser mantido em bancos de sêmen por prazo indeterminado, o que possibilita o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados, eliminação do problema de assincronia da atividade reprodutiva entre machos e fêmeas, redução do número de reprodutores machos mantidos na estação de piscicultura, com conseqüente redução dos custos (GODINHO, 2007). Vários autores sugerem que essa técnica pode ser usada em escala comercial com ótimas taxas de fertilização, na carpa *Cyprinus carpio* (LINHART et al., 2000), bagre Africano *Clarias gariepinus* (VIVEIROS et al., 2000) e em truta *Oncorhynchus mykiss* (GLOGOWSKI et al., 2000).

2.5.1 Processo de criopreservação

A técnica de congelamento celular pode ser dividida em três etapas: (1) As células são submetidas a uma solução crioprotetora (metanol, etilenoglicol, glicerol e outros) que penetra na célula e substitui a maior quantidade de água intracelular. (2) Posteriormente, a célula deve regular a osmolaridade, ficando isotônica com o meio extracelular, o que pode causar efeitos tóxicos e impacto osmótico nas mesmas. (3) Finalmente, diminui-se a temperatura passando pelo ponto de congelamento da água e da solução crioprotetora onde, segundo a curva de congelamento empregada, se realizará de maneira diferente a formação de cristais, os quais podem danificar a célula (LEZCANO, 2001). Existem vários utensílios e equipamentos para congelar as amostras de sêmen, sendo os mais utilizados as geladeiras de isopor, *dry shippers*, freezers reguláveis e botijões criogênicos, dentro dos quais são introduzidas palhetas francesas plásticas, cujo volume pode ser de 0.25, 0.5 e 5 mL (MAISSE et al., 1998).

O *dry shipper* é um contêiner para transportar com segurança amostras em temperaturas criogênicas. Trata-se de um botijão em alumínio de 50 cm de altura x 30 cm de diâmetro, cujo interior está recoberto por um material de absorção e no meio possui um cilindro onde se suspende uma caneca onde são colocadas as amostras, as quais também são congeladas com os vapores do nitrogênio (PESSOA, 2010). Este equipamento foi testado para criopreservação do sêmen de piracanjuba (MURGAS et al., 2003) obtendo motilidade espermática pós-descongelamento de 74,17% nas amostras criopreservadas com diluidor contendo 5% Glicose, 10% DMSO e 5% gema de ovo.

Esse equipamento também foi utilizado com sucesso na criopreservação do sêmen de pirapitinga (VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008; NASCIMENTO et al., 2010; PESSOA, 2010), curimba (*Prochilodus lineatus*) e piapara (*Leporinus obtusidens*) (VIVEIROS et al., 2008).

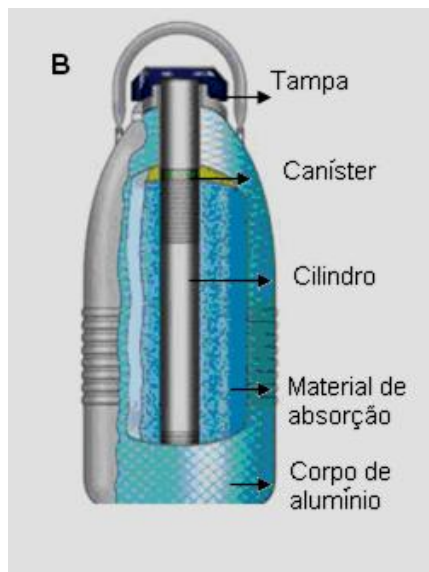


Figura 5 - Equipamento para criopreservação: *Dry shipper*

2.5.2 Crioprotetores e diluentes de congelamento

O sêmen puro é praticamente impossível de ser congelado, necessitando tanto da adição de crioprotetores como de meios diluentes. Sendo estes últimos soluções de sais ou de carboidratos, que adicionados ao sêmen, mantêm a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura. As condições mínimas requeridas para um diluente adequado são: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estabilidade, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozoides; esterilidade, ou seja, não devem vincular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas; e, finalmente, servir de carreador de crioprotetores. É importante que a motilidade dos espermatozoides não seja ativada antes do congelamento e nem durante o descongelamento, pois a mesma pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização (LEGENDRE & BILLARD, 1980). Já foram testados, com sucesso, como diluentes de sêmen de peixe o BTS – Beltsville Thawing Solution®) (MURGAS et al., 2007), 5% de glicose (NASCIMENTO et al., 2010), água de coco *in natura* (FARIAS et al., 1999), água de coco em pó (PESSOA, 2009) entre outros.

Crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja proteção do espermatozoide contra as crioinjúrias durante o congelamento e o descongelamento

(VIVEIROS, 2005), além disso, devem possuir baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (BATISTA et al., 2006). Quando esses crioprotetores são internos, os espermatozóides iniciam um progressivo re-crescimento causado pelo fluxo de crioprotetor de fora para dentro do espaço intracelular tentando re-estabelecer o equilíbrio osmótico. No entanto, a desidratação e re-crescimento dependem da concentração dos crioprotetores, temperatura, superfície de troca e coeficiente de permeabilidade do tipo celular (ASTURIANO et al., 2007).

Na maioria dos trabalhos, a combinação desses dois agentes (crioprotetores e diluentes) é diferente, sendo muito difícil saber qual é o fator ideal para cada espécie, já que eles atuam de forma distinta (MAISSE et al., 1998).

Entre os crioprotetores mais utilizados na criopreservação do sêmen de peixe podem ser citados crioprotetores internos como o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol usados geralmente a uma concentração de 10% (NIZIO, 2005). Outra substância crioprotetora que vem sendo utilizada é o metilglicol, relativamente não tóxico e já foi testado com sucesso na criopreservação de sêmen de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (MARIA et al., 2006), curimba, *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al., 2008), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (ÓRFÃO et al., 2008) e, mais recentemente, em pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010).

2.5.3 Diluente a base de água de coco em pó

A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras e eletrólitos diversos, além de indutores da divisão celular, fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (BLUME & MARQUES JR., 1994). A água de coco *in natura*, após corrigidos a osmolaridade e o pH para o sêmen da espécie respectiva, representa um diluente eficiente, com uma relação custo/benefício favorável aos programas de inseminação artificial no Brasil (NUNES & COBARNOUS, 1995).

A água de coco sob a forma de pó (ACP[®] - ACP Biotecnologia, Brasil), apresenta os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*, porém é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe (SILVA et al., 2006). A ACP[®] foi testada inicialmente como diluente de sêmen de caprino (SALGUEIRO et al., 2002), e mais recentemente na criopreservação de sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), curimba (*Prochilodus*

lineatus), piapara (*Leporinus obtusidens*) (VIVEIROS et al., 2008) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008) mantendo altas taxas de motilidade.



Figura 6 - Água de Coco em Pó (ACP®)

2.5.4 Danos causados pela criopreservação

Ao longo dos últimos anos, técnicas têm sido desenvolvidas para capacitar os espermatozóides para serem congelados satisfatoriamente para uma preservação indeterminada dos gametas com capacidade de fertilização (HAMMERSTEDT et al., 1990). Contudo, a criopreservação dos espermatozóides continua a provocar efeitos deletérios em relação à função espermática e fertilização (PURDY, 2006). Dois aspectos aos danos celulares ocorrem durante o processo de criopreservação: efeitos osmóticos e formação intracelular de gelo. Tais danos provocam perda da integridade da membrana, causando morte celular e modificações na habilidade de responder ao estresse ou manter o volume isotônico (PETRUNKINA et al., 2004). Segundo THUNDATTHIL et al. (1999), o processo de criopreservação está associado com danos a função dos espermatozóides, incluindo inchaço e ruptura da célula, perda da permeabilidade seletiva da membrana e mudança na sua fluidez, além de redução da motilidade e da viabilidade espermática.

A menor fertilidade das amostras de sêmen criopreservadas pode ser resultado da diminuição do número de espermatozóides normais nessas amostras (GRAVANCE et al., 1997).

Estudos anteriores usando a ASMA têm demonstrado que a criopreservação afeta as dimensões da cabeça dos espermatozoides de touros (GRAVANCE et al., 1998), cervos vermelhos (ESTESO et al., 2003), cães (RIJSSELAERE et al., 2004) e suínos (ARRUDA et al., 2002) com menores valores após a descongelação. Em caprinos, a criopreservação não causou diferença significativa na morfometria da cabeça dos espermatozoides (GRAVANCE et al., 1997). Possíveis explicações para a redução das dimensões morfométricas após a criopreservação em mamíferos são a progressiva desidratação celular durante o processo de criopreservação (ENGLAND, 1993), alta proporção de espermatozoides com danos no acrossoma e subsequente perda de conteúdo acrossomal (GRAVANCE et al., 1998; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1993) e mudanças na estrutura da cromatina espermática (ROYERE et al., 1988).

3 JUSTIFICATIVA

As técnicas de preservação do sêmen podem auxiliar em programas de melhoramento genético e formação de um banco para conservação dos recursos genéticos. No entanto, diversos trabalhos têm mostrado que as taxas de fertilização estão intimamente relacionadas com a morfometria dos espermatozóides que pode ser alterada durante o processo de criopreservação.

Dessa forma, é necessário saber os parâmetros morfométricos dos espermatozóides de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) antes do congelamento e suas mudanças pós-descongelamento, especialmente em criopreservação utilizando-se a água de coco em pó, por ser um diluente de custo benefício aceitável para o mercado. Estas características representam o estado dos gametas no momento do congelamento e podem revelar possíveis criodanos causados por este processo.

As técnicas de microscopia eletrônica são precisas, mas de difícil execução, sendo, portanto, a análise da morfologia espermática auxiliada por computador (ASMA) ideal para esse tipo de avaliação.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Após criopreservação em ACP-104, não ocorrem mudanças na estrutura celular dos espermatozoides de Pirapitinga nem na cinética espermática.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação de diluidores e crioprotetores sobre a morfometria da cabeça e a cinética de espermatozóides de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento em relação ao sêmen fresco.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar os padrões morfométricos da cabeça e cinética dos espermatozóides de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*);
- Avaliar a morfometria da cabeça e cinética dos espermatozóides de Pirapitinga pós-descongelamento;
- Comparar a morfometria da cabeça e cinética dos espermatozóides de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) provenientes do sêmen fresco e criopreservado desta espécie.

6 Capítulo 1

**Analysis of sperm head morphometry of Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*)
criopreserved in powder coconut water (PCW-104™) or Ringer added
cryoprotectants**

Periódico: Theriogenology (submetido em 10/2010)

Fator de impacto: 2,07

**Analysis of sperm head morphometry of Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*)
criopreserved in powder coconut water (PCW-104™) or Ringer added
cryoprotectants**

M.A.P Melo^a, F.S. Maciel^a, L.V. Leite^a, F.C.E. Oliveira^a, C.C. Campello^b, C.C.M.
Salgueiro^c, C.S.B. Salmito-Vanderley^a, J.F. Nunes^{a,*}

^aLaboratory of Semen Technology, Biotechnology Integrated Nucleus, Veterinary
Department, Ceará State University, 60740-903, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bLaboratory Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles, Ceará State
University, 60740-903, Fortaleza, Ceará, Brazil

^cACP Biotecnologia, 60442-611, Fortaleza, Ceará, Brazil

* Corresponding author: Universidade Estadual do Ceará. Av. Dedé Brasil, 1700.
Campus do Itaperi. Núcleo Integrado de Biotecnologia. Bairro: Parangaba. CEP: 60740-
903. Fortaleza. Ceará. Brasil. Tel.: +55-85-31019851; Fax: +55-85-31019840.

E-mail address: ferreiranunes@pq.cnpq.br

Abstract

This study was designed to evaluate the association of extenders and cryoprotectants on the sperm head morphometry of Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after thawing compared to fresh semen. Thirty Pirapitinga males were hypophysectomized 14 hours before semen collection. One aliquot of each seminal sample valid was fixed for morphometric analysis and the remainder formed the pool which was divided into three parts. The first part was frozen in PCW-104™ or Ringer added 10%

of Dimethyl sulfoxide (DMSO) or 10% of methylglycol (MG) with a dilution rate of 1:4 or 1:6 (semen: extender) and filled into 0.50 mL straws. The second, together with individual samples from each animal, was fixed for subsequent morphometric analysis. The third was transported to the laboratory in styrofoam at 4° C for analysis of objective motility post-activation. All analysis was carried out using the software Sperm Class Analyzer. After 45 days, the straws were thawed and sperm were assessed for motility and morphology. The data were submitted to ANOVA and motility was compared using the Kruskal-Wallis. Morphometric data were compared between treatments using the SNK test and the control by Dunnett test ($p < 0.05$), expressed as mean and standard deviation. After thawing, all treatments had significantly lower motility compared to the control, and the samples preserved in PCW-104™ had significantly higher motility compared to those preserved in Ringer ($p < 0.05$). Related to sperm head morphometry of fresh semen, the means values were: length $3.3784 \pm 0.132 \mu\text{m}$, width $0.075 \pm 2.3391 \mu\text{m}$, area $0.386 \pm 7.3130 \mu\text{m}^2$, perimeter $9.7249 \pm 0.332 \mu\text{m}$, elongation 0.1843 ± 0.018 , ellipticity 0.055 ± 1.4592 , regularity 0.8536 ± 0.009 and roughness 0.9589 ± 0.027 . After cryopreservation, there was no influence of dilution rate used in any of the parameters evaluated, in addition, the samples preserved in Ringer showed area, perimeter, length and width similar to control. There were also no significant differences in the effects on the variables regularly and roughness ($p > 0.05$). The samples cryopreserved in PCW-104™ had significantly higher measures of length and perimeter that preserved in Ringer ($p < 0.05$). Respect to the width and consequently the area, samples cryopreserved in PCW-104™ were significantly superior to the control measures and to the samples preserved in Ringer ($p < 0.05$). There was a significant reduction in the ellipticity and elongation in all treatments after thawing as compared to control ($p < 0.05$). In addition, samples cryopreserved in PCW-104™ showed a significant reduction of these two

parameters compared to samples preserved in Ringer ($p < 0.05$). It can be concluded that, with a better sperm motility and greatest change in head after thawing, probably, cryopreservation in PCW-104™ made the sperm more adapted to survive in unfavorable conditions. This study was approved by CEUA (Ethics Committee for Animal Use of the Ceará State University) with protocol number 09230730-2.

Keywords: Fish; Semen; Computed-Assisted Semen Analysis; ASMA.

1. Introduction

The species *Piaractus brachypomus* (pirapitinga), endemic to the Amazon, belonging to characid is a highly commercial fish in other regions of Brazil. Recently, the decrease in genetic diversity observed in herds of breeding farms dedicated to the production of fingerlings and the frequent cyclic phenomena of droughts, which exert strong action on their reproductive processes, require the adjustment or development of technologies that enable the exchange of seminal material between producers, use of gametes which may be obtained from individuals wild and conservation of semen samples in less favorable times [1-2]. So, the freezing techniques have been used to control the assisted reproduction of many species of economic interest [3], the formation of semen banks of endangered species [4] and the maintenance of genetic variability in fish farms [5]. The application of this technique in fish is extensive development [6]; however, several aspects of sperm morphology are affected during this process. Changes in morphology are correlated with the decreased rate of fertilization in various animals [7]. Thus, it is necessary to identify the morphometric parameters of spermatozoa Pirapitinga (*P. brachypomus*) fresh and observe the changes after thawing.

The electron microscopy techniques are accurate but difficult to implement, therefore, the analysis of computer-aided sperm morphology (ASMA) is ideal for this

type of evaluation [8]. In fish, ASMA has been used to describe changes in the shape of the sperm caused by hormonal induction of spermiation [9] and the effects of dilution rate, used cryoprotectants and cryopreservation media supplementation [10].

Already been tested successfully as semen diluents fish, *in natura* coconut water [11] BTS - Beltsville Thawing Solution[®] [6] and more recently the PCW[™] - powder coconut water, which is a solution composed of salts, proteins, sugars, vitamins, neutral fats, as well as inducers of cell division and various electrolytes, providing the nutrients necessary for the preservation of sperm cells [12]. The PCW[™] was initially tested as an extender of goat semen [13] and more recently in cryopreservation of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), curimba (*Prochilodus lineatus*), piapara (*Leporinus obtusidens*) [14], pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) [15] and tambaqui (*Colossoma macropomun*) semen [16] while maintaining high rates of motility.

Among the most commonly used cryoprotectants on cryopreservation of fish semen, may be cited the internal: Dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, methylglycol, methanol and ethylene glycol, commonly used at a concentration of 10% [14, 17-20]. The study aimed to evaluate the association of extenders and cryoprotectants on the Pirapitinga sperm head morphometry after thawing compared to fresh semen.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animal and collection

It was used 30 adult male Pirapitinga (*P. brachypomus*), identified by microchip, reared at the Aquaculture Research Center (CPAq) of the National Department of Works Against Drought (DNOCS) at Pentecoste, Ceará, Brazil, located between 03°45'00" S and 39°21'00" W, 90 km from Fortaleza. It was performed two semen collections from each animal. The first in October 2009 and the second in January 2010.

The animals received a single dose of carp pituitary extract (CPE: 2mg/kg body weight) for hormonal induction, 14 hours before semen collection. On the day of collection, the animals were sedated using a solution based on clove oil (Eugenol, Union Plant Nutritional Supplements Ltda.) [21], which was immediately subjected to semen collection after sedation and then returned to tank handling. For collection, each animal was restrained in lateral decumbency, eyes wrapped in damp cloth to minimize stress and facilitate retention. The genital orifice was dry with paper towel, and a mild abdominal compression was performed in the anteroposterior direction. Semen was collected and released the rates that were contaminated with feces, urine or blood were discarded, and the ones that showed a percentage less than 80% motile sperm after activation with water tank during the initial evaluation by an optical microscope [8].

An aliquot of 100 μ L of valid semen samples from each animal was fixed in saline formaldehyde solution 1% at proportion of 1:10 (semen: fixative) for morphometric analysis and the remainder formed the pools. The pools were formed from a mixture of valid semen samples from at least four animals, to eliminate the male effect.

These pools were divided into three parts, in which the first was frozen at CPAq, the second was fixed, as previously mentioned, for subsequent morphometric analysis, and the third was stored in a cooler with ice at 4°C for analysis of objective motility at the Laboratory of Semen Technology, Biotechnology Integrated Nucleus, Ceará State University.

2.2. Semen cryopreservation

For cryopreservation, the pool was extended into media based on powder coconut water for fish semen (PCW-104™) or Ringer modified for fish associated with

10% DMSO or 10% methylglycol and at dilution rates of 1:4 or 1:6 (semen: extender). The semen was immediately packed in straws of 0.5 mL with the aid of disposable syringes. The end of each straw was closed with polyvinyl alcohol. After filling, the straws were immediately transferred to a dry shipper where they received liquid nitrogen vapor (NL) to -174°C for 30 minutes, beginning then cryopreservation, were then stored immersed in NL at -196°C in cryogenic tanks [18]. Thawing was performed 45 days after freezing by removing the straws of the cryogenic tank and immersing in a water bath at 60°C for 8 seconds [19]. The straws were dried with paper towel and cut the ends with scissors and the sperm released in a test tube immersed in a water bath at 27°C . The thawed samples were analyzed for objective motility and fixed for morphometric analysis of the sperm head.

2.3. Assessment of sperm motility

The kinetic parameters of spermatozoa of fresh pool (control) and post-thaw samples were measured by computer-aided semen analysis using the software Sperm Class Analyzer (SCA[®], version 3.2., Microptics, Spain), binocular optical microscope (Nikon 50i) with phase contrast (Ph 1), a 40x lens and green filter, coupled to a camera for capturing images (Basler). The semen was deposited in a cell counting chamber (Makler chamber, depth 10 mL), after activation with NaCl (50 mM) in the ratio 1:50 (semen: NaCl) and performed the analysis of motility. It was analyzed approximately 2000 sperm per sample.

2.4. Assessment of sperm morphology

For morphometric analysis, two micro liters of the fixed samples were used for making smears of each animal from each pool and each treatment after thawing. Air

dried slides were stained with the kit for Panoptic CBC (Instant-Prov) dipping each slide twice in each of the three solutions of the kit. After drying the slides, they were mounted with cover slip using nail polish-stained. It was analyzed 200 sperm from each animal and each pool through the analysis of computer-aided sperm morphology (ASMA). Data obtained from morphometric analysis of sperm from the pool of fresh semen were called control. The program was set up so that all sperm were viewed with an increase of 40x, with interactive analysis and manual detection of sperm.

During the analysis, each sperm selected by the observer was scanned by the program. Were computed data on the length (L , in μm), the major axis of sperm head; width (W , in μm), the minor axis of the sperm head; perimeter (P , in μm), distance surrounding the sperm head; area (A , in μm^2), the surface of the sperm head. From these data were calculated, by the program, data on morphometric parameters, so that the ellipticity is the ratio between length and width (L / W). When this ratio was equal to 1, the sperm head was round, when greater than 1, the head was elongated. The elongation corresponds to the formula $L - W / L + W$. When the result of this formula is equal to 0, there was no elongation; therefore, the sperm is round. When more than 1, the sperm had a length greater than width, and when less than 1, the width was greater than the length.

The roughness ($4\pi A/P^2$) refers to the perimeter of an ellipse in relation to the perimeter of the sperm head. When the roughness was 1, the membrane was smooth, i.e. without roughness. The regularity ($\pi LW/4A$) is the ratio of the theoretical area of the ellipse and the actual area of the sperm head, and the closer to 1, more similar to an ellipse, or more regular was the head of the sperm.

2.5. Statistical analysis

Data on motility of fresh and post-thaw semen were submitted to analysis of variance (ANOVA) and compared by Kruskal-Wallis. The motility experiments were repeated eight times. For the morphometric analysis, data were tested for normality and homoscedasticity and were subjected to analysis of variance for randomized design. When main effects or their interactions were significant, means were compared by Student-Newman-Keuls (SNK). Comparisons with the control group were performed by the Dunnett test. The morphometric experiments were repeated five times. Differences were considered significant when $p < 0.05$, and the results were expressed as mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Semen collection

The animals reply well to hormonal treatment and had easy release of semen. A few samples were contaminated with blood, water, feces or urine. These samples were discarded from the experiment. No uncontaminated sample showed subjective motility less than 80% after activation with water tank. Semen samples from 30 pirapitinga showed milky white color. The major volume collected into specimens was 11 mL and the lowest was 1 mL. The pH did not vary greatly during the collections, and were around 8.5. The average weight of males, subjective sperm motility, semen volume and pH can be seen in Table 1.

Table 1: Average weight of males and fresh semen characteristics of pirapitinga (n = 30) collected in October 2009 and January 2010.

Characteristics	1 st collection	2 nd collection
Body weight (kg)	3.127	2.886
Subjective spermatic motility (%)	88	88
Semen volume (mL)	4,48	5,44
Semen pH	8,5	8,6

3.2. *Post-thaw sperm motility*

After freezing-thawing, all samples showed activation below 10%. After an objective analysis of the motility of sperm activated with NaCl after thawing, it was observed that all treatments had significantly lower total motility compared to control ($84.81 \pm 10.33\%$). When the comparison was made between treatments, there was no effect of dilution rate, 1:4 or 1:6 (semen: extender), or of cryoprotectants used in this study (DMSO and MG). However, when a comparison was made between the extenders PCW-104TM and Ringer, was found that motility was significantly higher in samples preserved in PCW-104TM (Table 2).

Table 2: Percentage of total sperm motility in fresh semen of pirapitinga (control) and frozen in PCW-104™ or Ringer added Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methylglycol (MG), with dilution rates of 1:4 or 1:6.

Total Sperm Motility (%)				
Control	84,81 ± 10,33			
	DMSO		MG	
	1:4	1:6	1:4	1:6
PCW-104™	20.97 ± 8.17* ^a	24.68 ± 14.12* ^a	20.32 ± 9.61* ^a	18.50 ± 17.44* ^a
Ringer	7.63 ± 7.78* ^b	9.93 ± 6.69* ^b	6.20 ± 2.82* ^b	8.24 ± 7.69* ^b

*Differ from control; ^{a,b}: Different lowercase letters between lines ($p < 0,05$)

3.4. Individual sperm morphometry

After head analysis of 200 sperm from each of the 30 animals was possible to obtain the average of the morphometric data: length $3.3784 \pm 0.132 \mu\text{m}$, width $2.339 \pm 0.075 \mu\text{m}$, area $7.313 \pm 0.386 \mu\text{m}^2$, perimeter $9.7249 \pm 0.332 \mu\text{m}$, elongation 0.1843 ± 0.018 , ellipticity 1.4592 ± 0.055 , regularity 0.8536 ± 0.009 and roughness 0.9589 ± 0.027 .

Sperm morphometry of fresh pool and post-thaw semen

Size parameters

After thawing, there were some changes in the pattern of sperm head morphometry. However, the dilution rate did not influence the observed parameters (Figure 1).

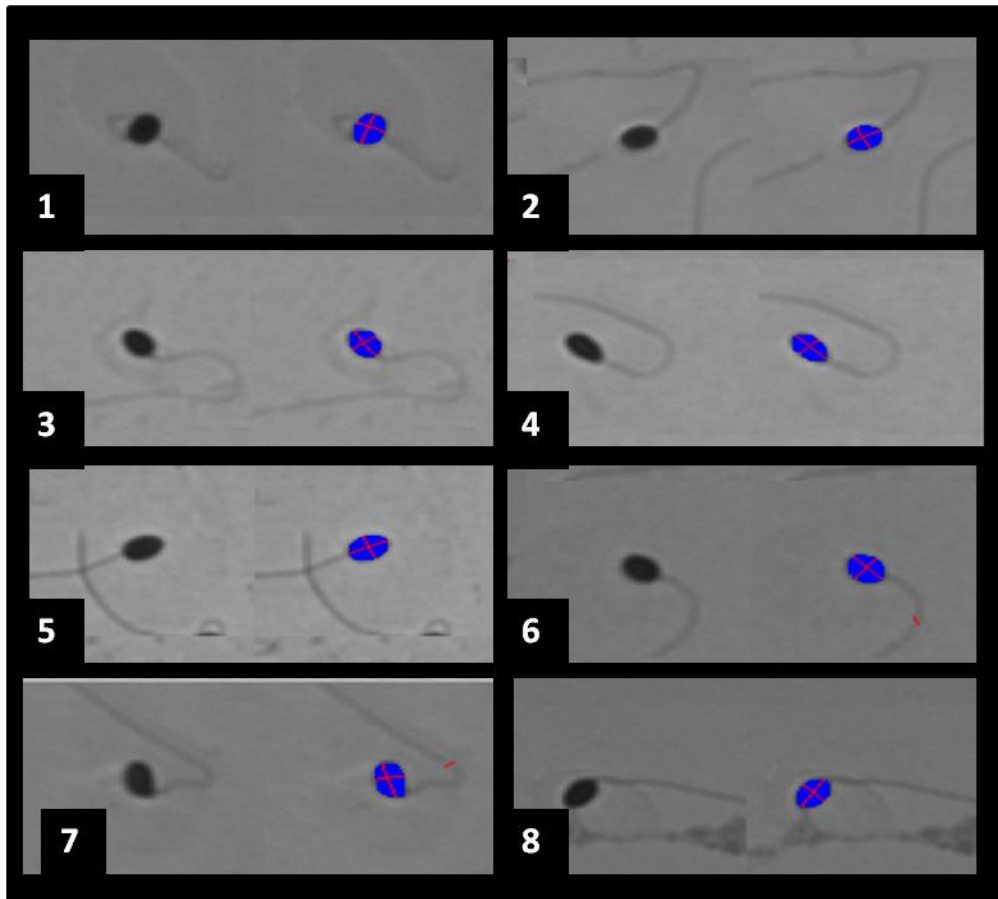


Figure 1: Morphometric analysis of head sperm of pirapitinga post-thaw before and after scanning by the program. (1) PCW-104[™] + DMSO, 1:4. (2) PCW-104[™] + MG, 1:4. (3) Ringer + DMSO, 1:4. (4) Ringer + MG, 1:4. (5) PCW-104[™] + DMSO, 1:6. (6) PCW-104[™] + MG, 1:6. (7) Ringer + DMSO, 1:6. (8) Ringer + MG, 1:6. 40x.

In relation to the sperm head width, no significant difference between semen treated with Ringer + DMSO ($2.46 \pm 0.06 \mu\text{m}$) and Ringer + MG ($2.39 \pm 0.06 \mu\text{m}$), being both similar to control ($2.39 \pm 0.04 \mu\text{m}$). However, the semen cryopreserved in PCW-104[™] + DMSO ($2.71 \pm 0.05 \mu\text{m}$), the sperm head width showed significantly superior to cryopreserved in PCW-104[™] + MG ($2.60 \pm 0.07 \mu\text{m}$), which were significantly higher than the control (Table 3).

Table 3: Width (μm) from pirapitinga sperm head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104TM or Ringer added Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methylglycol (MG).

	Width (μm)	
	DMSO	MG
Control	2.39 \pm 0.04	
PCW-104 TM	2.71 \pm 0.05 ^{*Aa}	2.60 \pm 0.07 ^{*Ba}
Ringer	2.46 \pm 0.06 ^{Ab}	2.39 \pm 0.06 ^{Ab}

**Differ from control; ^{a,b}: Different lowercase letters between lines; ^{A,B}: Different capital letters between columns ($p < 0,05$).*

Measures related to the area, length and circumference were not affected by cryoprotectant used or the rate of dilution. In relation to the area, samples cryopreserved in PCW-104TM ($8.56 \pm 0.63 \mu\text{m}$) was significantly greater than control ($7.72 \pm 0.53 \mu\text{m}$) and that the samples cryopreserved in Ringer ($7.56 \pm 0.65 \mu\text{m}$). Respect to length ($3.48 \pm 0.14 \mu\text{m}$) and perimeter ($10.06 \pm 0.44 \mu\text{m}$), it has no changes in these parameters compared to control. However, when a comparison was made between the extenders, it was observed a significant increase in length ($3.53 \pm 0.13 \mu\text{m}$) and perimeter ($10.47 \pm 0.38 \mu\text{m}$) in the samples cryopreserved in PCW-104TM in relation to the length ($3.34 \pm 0.24 \mu\text{m}$) and perimeter ($9.76 \pm 0.66 \mu\text{m}$) from cryopreserved in Ringer (Table 4).

Table 4: Area, length and perimeter of spermatozoa head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104™ or Ringer.

	Area (μm^2)	Length (μm)	Perimeter (μm)
Control	7.72 ± 0.53	3.48 ± 0.14	10.06 ± 0.44
PCW-104™	$8.56 \pm 0.63^{*a}$	3.53 ± 0.13^a	10.47 ± 0.38^a
Ringer	7.56 ± 0.65^b	3.34 ± 0.24^b	9.76 ± 0.66^b

**Differ from control; ^{a,b}: Different lowercase letters between lines ($p < 0,05$).*

Shape parameters

There was no influence of cryoprotectant, or the dilution rate, for the ellipticity parameter. However, after cryopreservation, this value was significantly lower when compared with control ($1.45 \pm 0.03 \mu\text{m}$) independent of the extender used, Ringer ($1.41 \pm 0.03 \mu\text{m}$) or PCW-104™ ($1.33 \pm 0.04 \mu\text{m}$), and this reduction was more significant for samples cryopreserved in PCW-104™ (Table 5).

Table 5: Ellipticity of spermatozoa head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104™ or Ringer.

	Ellipticity
Control	1.45 ± 0.03
PCW-104™	$1.33 \pm 0.04^{*b}$
Ringer	$1.41 \pm 0.03^{*a}$

**Differ from control; ^{a,b}: Different lowercase letters between lines ($p < 0,05$).*

After cryopreservation, there was a significant reduction in elongation rate in all treatments compared to control (0.1799 ± 0.0068). Furthermore, there was a significant decrease when the samples were cryopreserved in PCW-104™ + DMSO (0.1305 ± 0.0087) compared to those cryopreserved in Ringer + DMSO (0.1697 ± 0.0093). However, this reduction was not observed when samples were preserved with methylglycol (Table 6).

Table 6: Elongation of spermatozoa head in fresh semen (control) and frozen in PCW-104™ or Ringer added Dimethyl sulfoxide (DMSO) or methylglycol (MG).

	Elongation	
	DMSO	MG
Control	0.1799 ± 0.0068	
PCW-104™	$0.1305 \pm 0.0087^{*Bb}$	$0.1497 \pm 0.0108^{*Ba}$
Ringer	$0.1697 \pm 0.0093^{*Aa}$	$0.1670 \pm 0.0114^{*Aa}$

**Differ from control; ^{a,b}: Different lowercase letters between lines; ^{A,B}: Different capital letters between columns (p < 0,05).*

It was no significant differences in the effects tested on the variables regularly and roughness ($p > 0.05$). The overall averages for these variables were 0.87 ± 0.05 and 0.96 ± 0.04 , respectively.

4. Discussion

The seminal collections made in this study occurred in the pirapitinga breeding season. Differences of the seasons lead to differences in water quality, feeding and

sexual maturity of the animals which affect sperm quality [17]. The semen volume found in this study was different from other studies with that species, being higher than that found by Pessoa [18], which held its collections outside the breeding season, between June and September, and lower than that found by Velázquez -Medina [15], which held its collections in the middle of the season (December and January). It was also observed a reduction in weight of animals. This is due to the fact that in nature, the spawning fish, such as pirapitinga, migrate upstream out of the food environment in search of reproductive environment [22].

Our results confirmed the Pessoa [18] where there was no significant difference in post-thaw motility of cryopreserved samples with dilution rates of 1:4 and 1:6, independent of the extender or cryoprotectant used. This result is similar to that found by Godinho et al. [23] that found no significant difference between the dilutions 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4. This is probably due to the fact that these rates are very similar, not bringing direct effects of the proportion of extender on sperm motility. In addition, samples cryopreserved in PCW-104™ had significantly higher motility compared to cryopreserved in Ringer. Best results of post-thaw motility in samples cryopreserved in PCW-104™ are because of the powder coconut water have substances in their composition in favor of cryopreservation as fructose and glucose, which act as external cryoprotectants, protecting the cell membrane, and antioxidants such as ascorbic acid, which fight free radicals during cryopreservation [24].

In the present study was performed morphometric analysis of 200 sperm head of each animal from each pool and each treatment. Previous work with goats [25] show that the analysis of only 100 sperm stained with Diff-Quick is sufficient because it did not present significant difference in analysis of 150, 175 and 200 sperm. The standardization of a minimum number of spermatozoa to be analyzed is interesting

since the morphometry technique, for fish, is very laborious, because the sperm of this class are much smaller than those of mammals, often being confused with the program artifacts. Another difficulty in this process was the lack of information on the step of coloring fish semen. The limited success of this step can also occur due to numerous artifacts produced during the making of the smears [26]. According to Verstegen et al. [27], the dyes do not necessarily provide an appropriate contrast in gray scale for an accurate analysis by the program.

Tuset et al. [26] obtained satisfactory results for spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using Hemacolor and Diff-Quick, dyes similar to that used in this study. In pre-test (unpublished data), various dyes were tested as Panoptic of CBC, Diff-Quick, Bromophenol Blue and Rose Bengal, and the CBC Panoptic of the most efficient for morphometric analysis of the sperm head of pirapitinga. However, spermatozoa were strongly stained, making it difficult to capture images of the program. Because of this, the exposure time of the smear to the manufacturer's suggested colors (five dives) was decreased for two dives in each substance-kit staining, which significantly improved the analysis.

The analysis of sperm head morphometry of pirapitinga has shown that these have an area ($7.31 \mu\text{m}^2$) much smaller than the sperm of mammals ($29.02 \mu\text{m}^2$) [25]. The smaller size is probably due to lack of acrosome, which is unnecessary to externally fertilizing fish, because they do not achieve acrosome reaction, going through a hole in the oocyte called micropyle [28]. The average area ($7.31 \mu\text{m}^2$), perimeter ($9.72 \mu\text{m}$), width ($2.33 \mu\text{m}$) and length ($3.37 \mu\text{m}$) from the sperm head found in this study are similar to area ($7.25 \mu\text{m}^2$), perimeter ($9.99 \mu\text{m}$), width ($2.67 \mu\text{m}$) and length ($3.22 \mu\text{m}$) from the sperm head of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) found by Tuset et al. [26].

Despite showing significantly lower motility of samples cryopreserved in PCW-104™, the semen cryopreserved in Ringer maintained the head size (length, width, area and perimeter) similar to control. The motility reduction may be due to sperm midpiece and tail damage during the cryopreservation process, being these two structures essential for motility. Velázquez-Medina [15] examined the morphology of pirapitinga spermatozoa before and after freezing with the extenders Ringer, PCW-104™ and glucose, added to the cryoprotectant DMSO and MG, finding a significant increase in problems related to the sperm tail in the samples fresh (5%) compared to samples cryopreserved, regardless of the extender or cryoprotectant used (23%). Similar results were found previously by Gravance et al. [29], working with goat semen, where they obtained less than 30% motility post-thaw and sperm head morphometry similar to the samples before freezing.

For samples cryopreserved in PCW-104™, width, and consequently the area, showed measures significantly higher compared to control. This finding contradicts those presented in the literature in which Asturiano et al. [30], working with European eel, found that a significant reduction in area and perimeter of the head occurred after sperm cryopreservation. Probably this phenomenon was due to nucleus super condensation. In European seabass (*Dicentrarchus labrax*), sperm exposure to DMSO caused a concentration-dependent reduction in the overall size of the cell [31].

In this study, an increase of the sperm head may be due to the high permeability of the sperm membrane to PCW-104™, despite this product is derived by dehydration of the integral coconut water, without fractionation, where the level of its constituents is in agreement with the natural balance found in nature, in proportions consistent with the body fluids such as blood plasma and seminal plasma, making the extender to interact with the seminal plasma, among rapidly in homeostasis, maintaining and even

improving the conditions of viability. Moreover, the amount of sodium and potassium may have interfered with their pumps sodium and potassium active transport mechanism of sperm membrane.

The parameters of shape, ellipticity and elongation are directly dependent on the sperm length and width and are related to the round or oval of them. In this paper, these two shape parameters showed significantly lower than the control after cryopreservation, however, this result was due to increased width of the sperm head.

5. Conclusion

We would like to emphasize that it is the first time that the ASMA methodology is applied to morphometric characterization of the sperm head of pirapitinga before and after thawing. And that, in light of improved post-thaw motility of sperm extended in PCW-104™ and greatest change in the head, probably, cryopreservation with PCW-104™ made the sperm more adapted to survive under unfavorable conditions during the cryopreservation process. More studies should be conducted in search of a better understanding of the changes during sperm cryopreservation and its influences on semen quality post-thaw.

Acknowledgments

This research was supported by grants from de Cearense Foundation to Scientific and Technological Support (FUNCAP), National Council for Scientific and Technological Research (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education (CAPES). We thank Dr. Pedro Eymard, to the Aquaculture Research Center (CPAq) of the National Department of Works Against Droughts (DNOCS), for make available the

animals and the physical and laboratorial structures. We also thank the enterprise ACP Biotecnologia, for extended based on powder coconut water (PCW-104™) donation.

References

- [1] Farias J. Avaliação “*in vitro*” e “*in vivo*” do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
- [2] Fresneda A, Lenis G, Agudelo E, Angel MO. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev Col Cienc Pec 2004;17:46-52.Sup.
- [3] Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhart O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture 1995;129:95-112.
- [4] Harvey B. Banking fish genetic resources: the art of the possible. In : CASTRI F, YOUNES T. Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership. Wallingford: CAB International 1996;439-445.
- [5] MC Andrew BJ, Rana KJ, Penman DJ. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: MUIR JF, ROBERTS RJ. Recent Advances in Aquaculture, v. IV. Oxford: Blackwell Science 1993;295-336.
- [6] Murgas LDS, Miliorini AB, Freitas RTF, Pereira GJM. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. Ver Bras. Zootec 2007; 36(3):526-531.
- [7] Sekoni VO, Gustafsson BK. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. Br Vet J 1987;143:312–317.
- [8] Marco-Jiménez F, Peñaranda DL, Pérez L, Viudes-de-Castro MP, Mylonas CC, Jover M, Asturiano JF. Morphometric characterization of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA). J Appl Ichthyol 2008;24:382–385.
- [9] Asturiano J F, Marco-Jiménez F, Pérez L, Balasch S, Garzón DL, Peñaranda DS, Vicente JS, Viudes de Castro MP, Jover M, Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. Theriogenology 2006;66:1012–1020.
- [10] Marco-Jiménez F, Pérez L, Viudes de Castro MP, Garzón DL, Peñaranda DS, Vicente JS, Jover M, Asturiano JF. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. Theriogenology 2006;65:1302-1310.

- [11] Farias JO, Nunes JF, Carvalho MAM, Salgueiro CCM. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. Ver Cien Prod Anim 1999;1(1):44-58.
- [12] Blume H, Marques Jr AP. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. Rev Bras Reprod Anim 1994;18(3-4):97-104.
- [13] Salgueiro CCM, Nunes JF, Oliveira KPL, Vieira VL, Gondim JM, Mateos-Rex E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. Rev Bras Reprod Anim 2002;5:96-98.Sup.
- [14] Viveiros, ATM, Maria, AN, Órfão, LH, Carvalho, MAM, Nunes, JF. Powder coconutwater (ACP[®]) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. Cybium–Int. J. Ichthyol. 2008. 32 (Supl.8th ISRPF), 215.
- [15] Velásquez-Medina S. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae), Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, 2008.
- [16] Vieira, MJAF. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) e criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104[®]). Fortaleza. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Núcleo Integrado de Biotecnologia, 2010.
- [17] Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MAM, Viveiros ATM. Out-of-season sperm cryopreservation in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). Anim Repro Science 2010;118:324-329.
- [18] Pessoa N.O. Avaliação cinética do sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio a base de água de coco em pó (ACP-104[®]) ou Ringer em três meios de ativação. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Núcleo Integrado de Biotecnologia, 2009.
- [19] Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture 2006;260(1/4):298–306.
- [20] Maria, AN. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Lavras. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2005.
- [21] Mylonas CC, Cardinletti G, Sigelaki I, Polzonetti-Magni A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture 2005;246:467-481.
- [22] Godinho, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Rev Bras Reprod Anim 2007;31(3):351-360.

- [23] Godinho HP, Amorim VMC, Peixoto MTD. Criopreservação do Sêmen de Tilápia-*Nilótica Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, Soluções Ativadoras e Refrigerador Criogênico. Rev Bras Zootec 2003;32(6):537-1543
- [24] ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimento. Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Análises físico-químicas, 2009.
- [25] Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. Theriogenology 2006;66:996–1003.
- [26] Tuset VM, Dietrich GJ, Wojtczak M, Slowinska, Monserrat J, Cieresko A. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology 2008;69:1033-1038.
- [27] Vertegen J, Iguer-Ouada M, Onelin K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology 2002;57:149–79.
- [28] Morales J. Acuicultura Marina Animal. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1986.
- [29] Gravance CG, White C, Robertson KR, Champion ZJ, Casey PJ, The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. Anim Reprod Sci 1997;49:37–43.
- [30] Asturiano JF, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Garzón DL, Pérez L, Vicente JS, Jover M. Effect of Sperm Cryopreservation on the European Eel Sperm Viability and Spermatozoa Morphology. Reprod Dom Anim 2007;42:162–166.
- [31] Peñaranda DS, Perez L, Fakriadis G, Mylonas CC, Asturiano JF. Effects of extenders and cryoprotectant combinations on motility and morphometry of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. J Appl Ichthyol 2008;24:450-455.

7 CONCLUSÃO

Não tinha sido utilizado ainda a metodologia ASMA para a caracterização morfológica da cabeça de espermatozoides de pirapitinga antes e após o descongelamento. E que, a melhor motilidade após o descongelamento do sêmen tratado com ACP-104 e alterações de cabeça, poderá estar relacionado à maior adaptação dos espermatozoides a sobrevivência em condições desfavoráveis durante os processos de criopreservação.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar análise ultraestrutural para confirmar a ausência de acrossoma nos espermatozóides de pirapitinga;
- Observar os possíveis danos causados durante o processo de criopreservação ao DNA espermático;
- Realizar testes de fertilização para verificar a capacidade fecundante desses espermatozóides pós-descongelamento;
- Observar a sobrevivência dos espermatozóides que não foram ativados pós-descongelamento;
- Elucidar como a criopreservação aumenta os danos na peça intermediária e cauda dos espermatozóides;
- Descobrir os mecanismos de ação do ACP-104 na célula espermática

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P.F.; OLIVEIRA, A.A.; NOBRE, M.I.S.N. Considerações sobre a amostragem da pirapitinga, *Colossoma brachypomum*, Cuvier, no estado do Ceará (Brasil). **Ciê. Agron.**, Fortaleza, p.43-49, Jun./Dez. 1990.

ANDRADE, D.; YASUI, G. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.166-172, 2003.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of Reproduction**, v.23, p.647-656, 1980.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M.; Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v.58, p.253–256, 2002.

ASTURIANO, J.F.; MARCO-JIMENEZ, F.; PÉREZ, L.; BALASCH, S.; GARZON, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; VICENTE, J.S.; VIUDES DE CASTRO, M.P.; JOVER, M. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. **Theriogenology** v. 66, p.1012–1020, 2006.

ASTURIANO, J.F; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PEÑARANDA, D.S.; GARZON, D.L.; PÉREZ, L.; VICENTE, J.S.; JOVER, M. Effect of sperm cryopreservation on the European Eel sperm viability and spermatozoa morphology. **Reprod. Dom. Anim.** v. 42, p. 162-166, 2007.

BATISTA, M.; ALAMO, D.; GONZALEZ, F.; CRUZ, M.G.; GRACIA, A.; Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultra freezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. **Reprod Dom Anim**, v.41, p.423-428, 2006.

BILLARD, R; MARCEL, J.; MATEI, D. Survive post mortem des gametes de truite fario, *Salmo trutta fario*. **Can. J. of Zoo.** n.59, p.29-33. 1980.

BILLARD, R. Ultraestruure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Res.** v. 228, p.205-218, 1983

BILLARD, R. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING, G. E (ed.). **Marshall' s Physiology of Reproduction**, 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, Chap. 3, p. 183-213, 1990a.

BILLARD, R. Artificial Insemination in Fish. In: LAMMING, G. E (Org.). **Marshall' s Physiology of Reproduction**, 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, Chap.9, p. 870-887, 1990b.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95- 112, 1995.

BLUME, H.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murúdeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 18, n. 3-4, p. 97-104, 1994.

CHANDLER, J.E.; PAINTER, C.L.; ADKINSON, R.W.; MEMON, M.A.; HOYT, P.G. Semen quality characteristics of dairy goats. **J Dairy Sci**, p. 46, 1988.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. **The male gamete: from basic science to clinical applications**, Viena, p. 162-186, 1999.

DE MONSERRAT, J.J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; TABLADO, L.; SOLER, C. The Sperm-Class Analyzer1: a new automated system for human sperm morphometry and classification. **Contracept Fertil Sex**, 1995.

ENGLAND, G.C. Cryopreservation of dog semen: a review. **J. Reprod. Fertil.** v.47, p. 243–255,1993.

ESTESO, M.C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. **CryoLetters**, v. 24, p. 261–268, 2003.

EVENSON, D.P. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. **J Histochem Cytochem**, v. 31, p. 248–53, 1983.

FARIAS, J. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 1998.

FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUEIRO, C.C.M.; Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Rev. Cient. Prod. Anim.* v.1, n.1, p. 44-58, 1999.

FRESNEDA, A.; LENIS, G. AGUDELO E.; ANGEL, M. O. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Rev Col Cienc Pec.**, v. 17, p. 46-52, 2004. Suplemento.

GLOGOWSKI, J.; KWASNILK, M.; PIROS, B.; DABROWSKI, K.; GORYECZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H; CIERESZKO, A. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: sêmen parameters and cryopreservation sucess. **Aquaculture Research**, v.31, p. 289-296, 2000.

GODINHO HP, AMORIM VMC, PEIXOTO MTD. Criopreservação do Sêmen de Tilápia-Nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, Soluções Ativadoras e Refrigerador Criogênico. **Rev Bras Zootec.** 32(6):537-1543. 2003

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Rev Brasileira de reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, jul/set, 2007.

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, P.J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. **Theriogenology**, v.46, p.1205–15, 1996.

GRAVANCE, C.G.; WHITE, C.; ROBERTSON, K.R.; CHAMPION, Z.J.; CASEY, P.J.; The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. **Anim. Reprod. Sci.**, v.49, p.37–43, 1997.

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.L.; CASEY, P.J.; Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **J Androl**, v.19, p.704-709, 1998.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73–88, 1990.

HARVEY, B. Banking fish genetic resources: the art of the possible. In : CASTRI, F.; YOUNES, T. **Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership**. Wallingford: CAB International, p.439-445, 1996.

HINES, R.; YASHOUV, A. Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil capito* Cuvier, a grey mullet. **J. of Fish Bio.**, n.3, p.123-127, 1971.

ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimento. Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. 392 Análises físico-químicas, 2009.

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.; SIMMONN, K.F.; SWANSON, R.J.; MATTA, J.F.; OEHNINGER, S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.49, p.112–7, 1988.

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

LEZCANO, M. Evaluación de cuatro agentes crioprotectores en la criopreservación de espermatoforos, masa y suspensión espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). Bogotá: **Universidad Jorge Tadeo Lozano**, 2001. 115p. (Monografía, Curso en Biología Marina).

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

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 295–304, 2006a.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GARZÓN, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. **Theriogenology**, v 65, p. 1302-1310, 2006b.

MARCO-JIMENÉZ, F.; PEÑARANDA, D.L.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; MYLONAS, C.C.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Morphometric characterization of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA). **J. Appl. Ichthyol.** v. 24, p. 382–385, 2008.

MARIA, AN. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Lavras. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2005.

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; FREITAS, R.T.F.; OLIVEIRA, A.V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298–306, Sept. 2006.

MAISSE, G.; LABBE, C.; OGIER DE BAULNY, B.; LEVERONI, S.; HAFFRAY, P. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. INRA. **Prod. Anim.** v.11, n.1, p.57-65, 1998.

MC ANDREW, B.J.; RANA, K.J.; PENMAN, D.J. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: MUIR, J.F. e ROBERTS, R.J. Recent Advances in Aquaculture, v. IV. **Oxford: Blackwell Science.** p.295-336, 1993.

MESA, M.; BOTERO, M. La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. **Rev. Colomb. Cienc. Pec.**, v.20, n.1, p.79-86, 2007.

MILIORINI, A. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal de Lavras**, Minas Gerais, 2006.

MORALES, J. Aquicultura Marina Animal. Madrid: **Ediciones Mundi-Prensa.** 670 p., 1986.

MYLONAS, C.C.; CARDINLETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A.; Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.

MURGAS, L.D.S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M.O.B.; MELLO, C.B.; FREITAS, R.T.F.; ZANGERONIMO, M.G. Calidad seminal Del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Anales de Veterinária de Murcia**, Espanha, v.17, p.8-16, 1998

MURGAS, L.D.S.; FRANCISCATTO, R.T.; SANTOS, A.G.O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1810-1814, 2003 (Supl 2)

- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação de semen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Ver Bras. Zootec.**, v.36, n.3, p.526-531, 2007
- NASCIMENTO, A.F.; MARIA, A.N.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.M; VIVEIROS, A.T.M. Out-of-season sperm cryopreservation in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, v.118, p.324-329, 2010
- NUNES, J.F.; COBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v.5, n.1-2, p.15-21, 1995.
- OMBELET, W.; POLLET, H.; BOSMANS, E.; VERECKEN, A. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. **Hum. Reprod.**, v.12, p.1015–1020, 1997.
- PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; FAKRIADIS, G.; MYLONAS, C.C.; ASTURIANO, J.F. Effects of extenders and cryoprotectant combinations on motility and morphometry of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. **J. Appl. Ichthyol.** v.24, p.450-455, 2008
- PESSOA, N.O. Avaliação cinética do sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio a base de água de coco em pó (ACP-104®) ou Ringer em três meios de ativação. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Estadual do Ceará**, 2009.
- PETRUNKINA, A.M.; GROPPER, B.; GUNZEL-APEL, A.R.; TOPFER-PETERSEN, E. Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen, **Reproduction** v.128, p.829–842, 2004.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin. Res.** v.63, p. 215–225, 2006.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; HOXACK, G.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser, **Theriogenology** v.62, p.1292–1306, 2004.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa, **J. Reprod. Fertil.** v.47 p.279–285, 1993.

ROYERE, S.; HAMAMAH, J.C.; NICOLLE, C.; BARTHELEMY, J.; LANSAC, J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies, **Gamete Res.** v.21, p.51–57, 1988

RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F.A.M.; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v.55, p.751–769, 2001.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.L.; GONDIM, J.M., MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 5, p. 96-98, Suplemento, 2002.

SEKONI, V.O.; GUSTAFSSON, B.K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. **Br Vet J.**, v.143, p.312–317, 1987.

SHIMODA, E. Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 2004. 121 p. Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, Campos dos Goytacazes, R J. Brasil

SILVA, A. R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L. D. M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP[®]) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.43, n.6, p.767-774, 2006.

TABARES, J.; TARAZONA, A.; OLIVERA, M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. **Rev. Colomb. Cienc. Péc.**, v.18, n.2, p.149-160, 2005.

TADDEI, A.R.; BARBATO, F.; ABELLI, L.; CANESE, S.; MORETTI, F.; RANA, K. J.; FAUSTO, A.M.; MAZZINI, M. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti) **Cryobiology**, v.42, p.244–255, 2001.

THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SODERQUIST, L.; MAPLETOFT, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen–thawed bull semen and fertility with artificial insemination, **Int. J. Androl.** v.22, p.366–373, 1999.

TUSET, V.M.; DIETRICH, G.J.; WOJTCZAK, M.; SLOWINSKA, M.; DE MONSERRAT, J.; CIERESZKO, A. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.69, p.1033-1038, 2008.

VÁSQUEZ-TORRES, W.; PEREIRA, M.F.; ARIAS-CASTELLANOS, J.A. Estudos para composição de uma dieta referência semipurificada para avaliação de exigências nutricionais em juvenis de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.283-292, 2002.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaratus brachypomus* (Pisces, Characidae), Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - **Universidade Federal do Ceará**, Instituto de Ciências do Mar, 2008.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONELIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149–79, 2002.

VIVEIROS, A.T.M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology**. v. 54, p.1305–1308, 2000.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.16, 2005, Goiânia, GO. **Palestras...** Goiânia, GO, 2005.

VIVEIROS, A. T.M.; MARIA, A.N.; ORFÃO, L.H.; CARVALHO, M A. M.; NUNES, J.F. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: International Symposium on Reproductive Phisiology of Fish, 8th, june 3-8 2007. **Abstracts**. Saint Malo: France, p.232, 2007. Abstracts Book.

VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N., ALAMMAN, I.B.A. Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen, **Anim. Reprod. Sci.**, 112, 293-300. 2009.

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

VOSS, J.L; PICKET, B.W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.178, p.287-9, 1981.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. FAO/CODEVASF/CNPq. 1983.