

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

NATHALIE OMMUNDSEN PESSOA

**AVALIAÇÃO CINÉTICA DO SÊMEN DE PIRAPITINGA
(*Piaractus brachypomus*) CONGELADO
EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ
(ACP-104®) OU RINGER EM TRÊS MEIOS DE ATIVAÇÃO**

FORTALEZA-CE

2009

NATHALIE OMMUNDSEN PESSOA

AVALIAÇÃO CINÉTICA DO SÊMEN DE PIRAPITINGA
(*Piaractus brachypomus*) CONGELADO
EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ
(ACP-104®) OU RINGER EM TRÊS MEIOS DE ATIVAÇÃO

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 Pequenos Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

FORTALEZA-CE
2009

NATHALIE OMMUNDSEN PESSOA

AVALIAÇÃO CINÉTICA DO SÊMEN DE PIRAPITINGA
(*Piaractus brachypomus*) CONGELADO
EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ
(ACP-104®) OU RINGER EM TRÊS MEIOS DE ATIVAÇÃO

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.

Aprovada em: 11/12/2009

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Ferreira Nunes (Presidente da Banca)

Orientador - Universidade Estadual do Ceará

Prof^a. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley

Co-orientadora - Universidade Estadual do Ceará

Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

Examinadora - Universidade Estadual do Ceará

Prof^a. Dra. Vânia Marilande Ceccatto

Examinadora - Universidade Estadual do Ceará

“Nós podemos explicar o azul-pálido desse pequeno mundo que conhecemos muito bem. Se um cientista alienígena, recém-chegado às imediações de nosso Sistema Solar, poderia fidedignamente inferir oceanos, nuvens e uma atmosfera espessa, já não é tão certo. Netuno, por exemplo, é azul, mas por razões inteiramente diferentes. Desse ponto distante de observação, a Terra talvez não apresentasse nenhum interesse especial. Para nós, no entanto, ela é diferente. Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas. Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento, todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas, todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes, criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses, jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças, todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, superastros, líderes supremos, todos os santos e pecadores da história de nossa espécie, ali - num grão de poeira suspenso num raio de sol. A Terra é um palco muito pequeno em uma imensa arena cósmica. Pensem nos rios de sangue derramados por todos os generais e imperadores para que, na glória do triunfo, pudessem ser os senhores momentâneos de uma fração desse ponto. Pensem nas crueldades infinitas cometidas pelos habitantes de um canto desse pixel contra os habitantes mal distinguíveis de algum outro canto, em seus freqüentes conflitos, em sua ânsia de recíproca destruição, em seus ódios ardentes. Nossas atitudes, nossa pretensa importância de que temos uma posição privilegiada no Universo, tudo isso é posto em dúvida por esse ponto de luz pálida. O nosso planeta é um pontinho solitário na grande escuridão cósmica circundante. Em nossa obscuridade, no meio de toda essa imensidão, não há nenhum indício de que, de algum outro mundo, virá socorro que nos salve de nós mesmos. (...)”

Carl Sagan

Para minha mãe Lena e meu padrastro, Jean-Marie

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Ferreira Nunes, por ser um exemplo de pesquisador e orientador, por acreditar em mim desde o começo, por ter realmente estendido a mão em todos os momentos antes e durante o mestrado.

À Dra. Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley, minha co-orientadora, por todos os momentos de co-orientação e aprendizagem, pelas valiosas sugestões e pela grande pessoa que é, contribuindo com meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pela dedicação ao meu crescimento na área de pesquisa, pelos momentos de desespero em que ela sempre vinha com a palavra certa, firme e doce e por ser essa pessoa tão inteligente e tão bonita por dentro e por fora que sempre terá minha admiração.

À Dra. Vania Marilande Ceccatto, pela competência e doçura, por aceitar sem hesitar o convite de participar da banca e por tornar a biologia molecular mais interessante aos meus olhos.

Ao Dr. Claudio Cabral Campello, por realizar as análises estatísticas desse trabalho com toda competência e boa vontade.

Aos funcionários de DNOCs, em especial ao Alexandre, Agenor, ‘Seu’ Vando, Raimundo, Luiz, Socorro e Pedro, pelo excelente acolhimento e auxílio durante todas minhas idas à Pentecoste. Muitos frutos ainda virão dessa parceria.

À Mônica Aline, mestrande do PPGCV, pelo apoio e principalmente pela organização, de fundamental importância tanto para o rendimento do trabalho como pelo treinamento dos estudantes de iniciação científica.

Aos estudantes de iniciação científica: Renan, Liliane, Cassia, Sérvulo, Thales, Felipe, Julia e Míriam, por sempre estarem prontos para aprender e ajudar. Sem eles, o trabalho teria sido bem mais laborioso e menos divertido.

Aos meus ex-ICs, Marcelo Bernardo, Breno, Dayanny e Gabriela, que mesmo não tendo ficado até o fim, trouxeram sua contribuição para esse trabalho.

À Ariane, amiga querida de Minduri, que me fez descobrir o entusiasmo em fazer pesquisas com peixes e me proporcionou os primeiros passos nessa direção.

Ao Gonzaga, por estar sempre disponível para imprimir o material que solicitava, resolver todos os problemas da melhor forma possível e me lembrar de assinar minha frequência.

À Barbara, Juliana, Cibele e Murad pelos momentos divertidos de descontração entre um experimento e outro.

Ao pessoal da graduação e pós-graduação do Núcleo Integrado de Biotecnologia que se desdobra com prazer para fazer o laboratório crescer cada vez mais: Maria Iraci Clemente, Míriam Luzia Nogueira Martins de Sousa, Eldon Bessa Rodrigues, Sarah Ramos Medeiros, Aline Ramos Souza, Juan Nádson Marques Melo, Felipe Silva Maciel, Fátima Cássia Evangelista de Oliveira, Thales Cordeiro Barbosa, Servulo Pinheiro Maia Filho, Liliane Veras Leite, Francisco Renan Aragão Linhares, Julia Trugilio Lopes, José Gonzaga da Silva Júnior, João Batista e Silva Júnior, Mateus Nunes Diógenes, Bárbara Mara Bandeira Santos, Edgar Tavares de Assis Neto, Oscar Oliveira Brasil, Mônica Aline Parente Melo, Carla Patrícia Mota Aragão, Eudes Vieira Castro, Cibele Cavalcanti Souza de Melo, José Maurício Maciel Cavalcante, Marcelo José da Ascensão Feitosa Vieira, Márcia Helena Niza Ramalho Sobral, Maria Audália Marques de Carvalho, Tânia Vasconcelos Cavalcante.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pelo auxílio e aprendizagem respectivamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo concedimento de minha bolsa de pós-graduação.

À minha querida e amada mãezinha, Lena Ommundsen, por toda a educação e caráter que me ensinou, por estar ao meu lado em todos os momentos me incentivando com força e apoio, por ser uma mulher forte, que apesar de pequeninha é mais corajosa que muitos gigantes e por ser meu exemplo de vida, sempre.

Ao meu querido padastro, Jean-Marie Alard, pela paciência, pelo exemplo de caráter e por fazer minha mãe muito feliz.

Ao meu querido Fábio, por agüentar todos os meus estresses e ansiedades com toda a paciência, pelo seu companheirismo e sua cumplicidade, por me fazer acreditar que existe amor para a vida toda.

Às minhas amigas, Rosemary, pela amizade fiel de longa data; Rejane, pela sua maneira tranquila e sábia que sempre me aconselhou em muitos momentos de desespero e fez rir em outros e finalmente Raquel, amiga querida que mora longe, com quem tenho conversas maravilhosas que vão desde a seriedade de um projeto à diversão de uma anedota.

À Tânia, pela gentileza, amizade sincera e pelos momentos de trabalho e descontração.

À Henninha, D'Avila, Marcella e Leonardo, pelos encontros que tivemos, pelo carinho e amizade.

À turma 2008.1 do mestrado em Ciências Veterinárias, em particular Liduína, pelo prazer da conversa com uma pessoa de inteligência brilhante e Michelle, 'de Mossoró', pelas risadas e angústias que só nós sabemos!

A todos aqueles, que de uma forma ou de outra estavam comigo nessa caminhada cujos nomes não tenha citado.

E finalmente agradeço também àqueles que não acreditavam em mim, que não me ajudaram e que desejavam que eu falhasse, sem esses, os desafios e as conquistas não seriam tão prazerosas.

RESUMO

A pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), é um peixe da família Characidae, originário das Bacias do rio Amazonas e Orinoco. O objetivo desse trabalho foi determinar a motilidade espermática de sêmen criopreservado em diferentes diluentes de *Piaractus brachypomus* e a ativação da motilidade com três soluções de ativação. As amostras de sêmen foram diluídas em quatro meios preparados pela combinação dos dois diluidores ACP-104, água de coco em pó e Ringer associados à dois crioprotetores, DMSO e metilglicol. Os dados mostram o NaCl e o NaHCO₃ como soluções de ativação, apresentaram resultados semelhantes entre si e significativamente superiores à água destilada. O tratamento ACP-104 associado ao crioprotetor DMSO apresentou ativação da motilidade espermática pós-descongelamento significativamente superior em relação aos demais tratamentos. Conclui-se portanto que a água de coco em pó modificada para peixes mantém a motilidade dos espermatozóides viável e demonstra ser um bom diluente para a criopreservação do sêmen nessa espécie.

Palavras-chave: Criopreservação, *Piaractus brachypomus*, Peixe, Sêmen, Motilidade

ABSTRACT

The pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1818) is a Characidae freshwater fish that inhabits the Amazon and Orinoco River basins. The aim of this study was determinate spermatoc motility of cryopreserved sperm of pirapitinga in three different activation solutions. Sperm samples were diluted in four freezing media prepared by a combination of two extenders ACP-104, coconut water powder and RINGER modified and two cryoprotectant agents (DMSO and methylglycol). Data shows NaCl and NaHCO₃ results were similar to each other and significantly superior to distilled water. The ACP-104 treatment associated with the cryoprotectant DMSO showed activation of sperm motility after thawing significantly higher compared to other treatments. In conclusion, therefore, the coconut milk powder modified to keep fish sperm motility feasible and proved to be a good diluent for sperm cryopreservation in this species.

Key-words: Cryopreservation, *Piaractus brachypomus*, Fish, Sperm, Motility

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Adulto macho de Pirapitinga.....	03
Figura 2. Padrões hormonais do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal.....	04
Figura 3. Hipofiseação do macho de Pirapitinga.....	05
Figura 4. Ativação da motilidade	09

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Pág.
Tabela 1-Peso dos machos e características do sêmen fresco de Pirapitinga.....	26
Tabela 2- Motilidade espermática pós descongelação do semen criopreservado em ACP-104 e RINGER associados aos crioprotetores DMSO ou Metilglicol após ativação utilizando três soluções de ativação de motilidade.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP [®]	água de coco em pó
ACP- 104	meio diluente para sêmen de peixe à base de água de coco em pó
CASA	análise de sêmen auxiliada por computador
SCA [®]	Sperm Class Analyser
VAP	velocidade média da trajetória
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade linear

SUMÁRIO

	Pág.
1.INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Espécie.....	03
2.2. Taxonomia.....	03
2.3. Reprodução.....	04
2.3.1.Regulação hormonal.....	04
2.3.2.Manipulação reprodutiva em cativeiro.....	05
2.4. Biologia do sêmen.....	06
2.4.1.Plasma seminal.....	06
2.4.2.Espermatozóides.....	07
2.4.3.Produção espermática.....	07
2.4.4.Motilidade.....	07
2.5. Resfriamento e criopreservação.....	10
2.5.1.Processo de congelamento.....	11
2.5.2.Diluentes.....	13
2.5.3. Crioprotetores.....	15
2.6. Análise Computadorizada.....	15
3.JUSTIFICATIVA.....	17
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	18
5.OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivos gerais.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19
6.CAPÍTULO 1.....	20
7.CONCLUSÕES.....	31
9. PERSPECTIVAS.....	32
10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
11. ANEXO.....	42

1. INTRODUÇÃO

A criação de peixes representa uma solução para a gradativa desaceleração da produção extrativista, uma vez que é realizada em ambientes reclusos e mais controlados, podendo assim proporcionar grandes produtividades. A piscicultura constitui-se na solução em potencial que poderá proporcionar incrementos de produção compatíveis com o aumento da população mundial. Não obstante, é a maneira mais econômica de se produzir alimento nobre e rico em proteína de alto valor biológico, uma vez que permite a utilização de resíduos agroindustriais e de áreas não agriculturáveis (FAO, 2007).

Nas últimas décadas, as populações naturais de peixes têm diminuído devido à degradação ambiental e pesca excessiva, o qual precipita a descaracterização e o desaparecimento do habitat natural e dos organismos que nele vivem (MILIORINI, 2006). Visando suprir esse desequilíbrio ecológico e aumentar os benefícios econômicos, a piscicultura gera constantemente inúmeros trabalhos no âmbito de técnicas de cultivo, controle de doenças, avaliação dos gametas produzidos em cativeiro e técnicas para congelamento seminal, entre outras (TANAKA et al., 2002).

O sêmen de peixes pode ser mantido viável por algumas horas quando resfriado em temperaturas pouco acima do congelamento (MARQUES; GODINHO, 2004). Essa prática facilita o processo de fertilização de ovos em estações de piscicultura, pois o sêmen pode ser coletado algumas horas antes da ovulação ocorrer. Baixas fecundidades podem ser motivados por alguns fatores relacionados à qualidade seminal: número reduzido de espermatozoides (baixo volume seminal, azoospermia ou hipospermia) ou atividade baixa (hipocinese, baixos vigor e turbilhonamento ou restrito tempo de movimentação).

Segundo Silveira et al. (1988), a avaliação das características seminais é importante na rotina de reprodução artificial em qualquer espécie animal. Para descrição de um perfil espermático são analisadas as características físicas do sêmen (volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração) e ainda as características morfológicas dos espermatozoides (FONSECA, 1992).

Na preservação a longo prazo (criopreservação), o sêmen congelado pode ser mantido em bancos de sêmen por prazo indeterminado (CAROLSFELD et al., 2003; MELO; GODINHO, 2006). Dentre as aplicações de banco de sêmen de peixes em aquicultura, destacam-se: i) redução ou eliminação do número de reprodutores (machos)

mantidos na estação com conseqüente redução de custos; ii) eliminação do problema da assincronia da atividade reprodutiva entre reprodutores, quando estes não estão preparados simultaneamente para a reprodução, como não raramente ocorre; iii) estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados (GODINHO, 2000).

O aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação tem sido muito estudado em peixes marinhos (ZHANG et al., 2003), entretanto, em espécies tropicais, ainda são reduzidos o número de estudos principalmente o uso do sêmen criopreservado e importado. O estudo sobre o uso de meio diluente é importante no sucesso da criopreservação e no transporte de sêmen. Há a necessidade, portanto, de se utilizar meios diluentes artificiais que atuem conservando, nutrindo e protegendo os espermatozoides do frio. Vários tipos de meios diluentes têm sido testados e elaborados com este propósito e cada etapa deverá ser testada e avaliada várias vezes até a redução máxima dos desvios (GODINHO et al., 2003; VELASCO-SANTAMARIA et al., 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécie



Fig. 1. Adulto macho de Pirapitinga

A Pirapitinga, de nome científico *Piaractus Brachypomus*, ocorre nas bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins. Podendo atingir 80 centímetros e pesar até 20 quilos. Esta espécie possui escamas e alimenta-se principalmente de frutas e plantas aquáticas, mas come também peixes menores. Apresenta grande importância na pesca comercial, como peixe ornamental e na gastronomia. O DNOCS importou na década de setenta alevinos dessa espécie para estudos biológicos e reprodutivos com o objetivo de criação em cativeiro. Os primeiros exemplares foram trazidos de Iquitos (Peru) com o objetivo de povoamento dos açudes e estocagem em viveiros para seu cultivo intensivo (SOBRINHO et al., 1984).

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

Dentre os peixes tidos como de alto valor comercial no Brasil, incluem-se alguns peixes reofílicos, cuja reprodução depende do fenômeno conhecido como piracema (CASTAGNOLLI, 1992). As fêmeas de Pirapitinga alcançam sua maturidade sexual aos três anos enquanto que nos machos ocorre ao final dos dois anos. Para que seja desencadeada uma série de processos hormonais que culminam na maturação final dos ovócitos e posterior desova, é necessária, nestes peixes, a migração reprodutiva. A desova ocorre no período de novembro a fevereiro, quando as condições ambientais se tornam ideais, com temperatura média de 27°C após as primeiras chuvas e essa espécie é de fecundação externa, onde há liberação dos gametas no meio ambiente.

2.3.1. Regulação Hormonal

Da mesma forma que nos mamíferos, o padrão hormonal reprodutivo dos peixes gira em torno do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal.

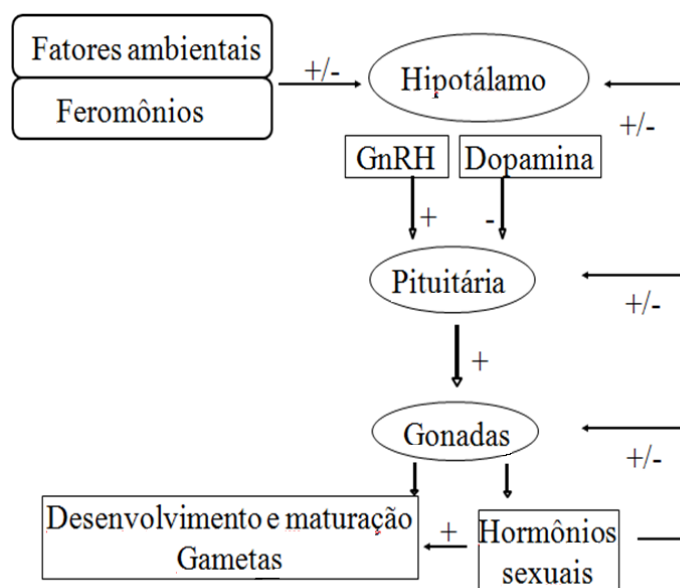


Figura 2- Padrões hormonais do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal

O hipotálamo, uma parte do cérebro, é ativado por fatores ambientais e químicos, como é o caso dos feromônios. Após esta ativação, diferentes neuropeptídeos [hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH)] são sintetizados e secretados. A forma do GnRH varia conforme a espécie de peixe (SOMOZA et al., 2002; SHERWOODE; WU, 2005), e o número de formas de GnRH por espécie varia de dois a

três. Apesar da multiplicidade do GnRH nos peixes, apenas uma das formas (a forma espécie específica, produzida na área pré-óptica do cérebro, e a única que se projeta diretamente através das fibras neurosecretórias na pituitária) regula a produção e a liberação de gonadotrofinas (GtH) pela pituitária. A pituitária produz dois GtH (GtH-I e GtH-II) que agem diretamente nas gônadas (SUZUKI et al., 1988a). Pelo significativo grau de homologia em relação aos hormônios mamíferos luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) (SUZUKI *et al.*, 1988b; ITOH et al., 1990), o GtH-I é hoje claramente identificado como o FSH dos peixes e o GtH-II como LH (YARON et al., 2003).

2.3.2. Manipulação reprodutiva em cativeiro

Ocorre que, nos cultivos em cativeiro, os peixes permanecem reclusos em ambientes lênticos, onde é impossível a piracema. Sendo a Pirapitinga uma espécie reofílica, para desovar, essa deve realizar o movimento migratório reprodutivo (piracema). Este evento participa no processo de desenvolvimento gonadal (aumento na produção espermática ou maturação final, ovulação e desova). Em tanques de piscicultura, esta migração fica impossibilitada e a reprodução apenas é viável mediante a utilização de técnicas de propagação artificial, como por exemplo, a hipofiseção. O termo “hipofiseção” refere-se à administração de extratos brutos de pituitária de peixes (FPE). Este processo foi desenvolvido na Argentina, há muitos anos (HOUSSAY 1930). O FPE é composto por hormônios gonadotróficos que estimulam a maturação das gônadas e a reprodução dos peixes. A técnica da hipofiseção consiste na aplicação de hormônios oriundos da hipófise de peixes doadores ou produzidos industrialmente (WOYNAROVICH; HORVATH, 1983). Goren et al. (1995) mostraram que o uso de implantes de um análogo de GnRH resultou em maior volume de líquido seminal no salmão do Atlântico (70 ml por peixe no grupo tratado, em comparação com 12 ml por peixe no grupo controle).



Figura 3- Hipofiseção do macho de Pirapitinga

2.4. Biologia do sêmen

Os testículos dos peixes teleósteos consistem, em muitos casos, de um par de estruturas alongadas compostas de túbulos seminíferos ramificados embebidos em estroma. Os testículos consistem de túbulos ou lóbulos de parede fina que contém células germe, as espermatogônias. Espermatogônias primárias estão, presentes durante todo o ano, dividem-se mitoticamente para originar as espermatogônias secundárias, que se transformam em espermatócitos primários. Estes se dividem por meiose e originam as espermátides, das quais se formam a espermatozoa. Os túbulos seminíferos são embalados com a espermatozoa nos períodos de pré-desova e desova (WINKOOP et al., 1995). Características como imobilidade do espermatozóide no sêmen, a curta duração de seu movimento após ativação e a necessidade de diluição em água para a iniciação do movimento espermático (BILLARD; COSSON, 1992) tem sido estudadas principalmente em salmonídeos e um pequeno volume em outras espécies (BILLARD, 1990a). Apesar de sua importância ecológica e social, de acordo com as publicações disponíveis, somente 0,7% de todas as espécies de peixe de água doce brasileiras, apresenta dados de algum aspecto de sua biologia seminal (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

2.4.1. Plasma seminal

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se a diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídios (PERCHEC et al., 1993; LAHNSTEINER et al., 1996), açúcares e ácidos (PIIRONEN; HYVÄRINEN, 1983), responsáveis pelo metabolismo do sêmen.

Shimoda et al. (1999), em estudos da composição química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) hipofisado, observaram que o pH do plasma ($8,74 \pm 0,17$) é superior ao verificado na maioria das espécies de peixes já estudadas. Obtiveram também as concentrações (em mMol/L) dos seguintes íons do plasma seminal: potássio ($37,3 \pm 4,1$), cálcio ($0,88 \pm 0,07$), magnésio ($0,73 \pm 0,09$), sódio ($83,1 \pm 9,4$), cloreto ($100,2 \pm 18,0$) e proteína ($0,732 \text{ mg/mL}$).

2.4.2. Espermatozóides

Os espermatozóides da maioria dos peixes não possuem acrossoma, característica que os diferencia do sêmen de mamíferos. Não necessitam dessa estrutura, pois os gametas, ao serem liberados no meio, entram diretamente na micrópila dos ovócitos, finalizando a fecundação (MORALES, 1986).

O espermatozóide de peixe com fecundação externa apresenta uma estrutura simples, com cabeça medindo de 2 a 4 μm , quase esférica e conformada por um núcleo onde se encontra o material genético, a peça intermediária constituída por centríolos e 2 a 9 mitocôndrias, um flagelo de comprimento entre 20 a 100mm com um axonema de 9 pares de microtúbulos periféricos e um par central. A membrana é composta de fosfolipídeos, lipídeos neutros e glicolipídeos, cuja função é de regularizar diferentes atividades celulares e vias de sinalização que podem conduzir à motilidade espermática (MELLINGER, 2002).

2.4.3. Produção espermática

A produção espermática de peixes é muito alta, devido ao grande número de divisões espermatogoniais. Entretanto, é difícil obter-se uma verdadeira análise quantitativa da espermatogênese em teleósteos, especialmente naqueles em que o testículo é lobular (BILLARD, 1990c).

Os peixes produzem quantidade variável de gametas. 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, 1990a).

2.4.4. Motilidade

O sêmen de peixe se encontra inativo dentro dos testículos (STOSS, 1983). O fluido seminal não só imobiliza os espermatozóides, como também oferece proteção (COSSON et al., 1999).

Quando os espermatozóides passam pelo conduto espermático, são banhados pelo fluido testicular ou plasma seminal, que apresenta pH básico e é rico em bicarbonato (HCO_3), fazendo com que eles permaneçam imóveis e com metabolismo

reduzido. As mitocôndrias se encontram com baixo potencial de membrana, a fim de preservar as reservas energéticas e diminuir a formação de compostos de oxidação. A motilidade se deve a mudanças na pressão osmótica, balanço iônico-energético e pH (TABARES et al., 2005).

- Pressão Osmótica

Os espermatozoides de peixes teleósteos de água doce são quiescentes na osmolaridade do plasma seminal, referida como uma condição isotônica (aproximadamente 300 mOsmol/kg). Eles começam a se mover quando suspensos em solução hipotônica (<300 mOsmol/kg) e exibem alta mobilidade (como % de espermatozoides móveis) em água doce (4 mOsmol/kg). De modo oposto os espermatozoides de teleósteos marinhos começam a se mover quando liberados em solução hipertônica (>300 mOsmol/kg), e exibem sua mais alta qualidade aproximadamente em 1000 mOsmol/kg, que é o equivalente ao encontrado na água do mar (MORISAWA; SUZUKI, 1980).

Quando ocorre a espermição 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. A motilidade espermática, reprimida pela osmolaridade isotônica do plasma seminal, é iniciada pela diminuição ou aumento da osmolaridade do meio externo. Em teleósteos, os espermatozoides, que são imóveis no plasma seminal, têm a osmolaridade em torno de 300 a 350 mOsm/kg em espécies tanto de água doce como salgada (MORISAWA; SUZUKI, 1980).

Para Krasznai et al. (1995), na iniciação da motilidade induzida por osmolaridade, a pressão osmótica extracelular e a concentração de K^+ diminuem resultando em uma hiperpolarização transitória da membrana. Tabares et al. (2005) relatam que essa hiperpolarização leva a um desenvolvimento progressivo da ativação da motilidade flagelar e também a um incremento do pH intracelular, alterado pelo aumento ou diminuição da concentração iônica interna.

Legendre et al. (1996) avaliaram que a imobilidade do sêmen de siluróides é resultado da pressão osmótica do fluido seminal como em ciprinídeos e não parece ser devido ao íon K^+ como acontece em salmonídeos. A hipotonicidade, segundo Stoss

(1983), é um dos únicos fatores que pode explicar a indução da motilidade em peixes de água doce.

- Balanço iônico-energético

O balanço iônico está relacionado com as mudanças nas concentrações extracelulares de K^+ , Na^+ , HCO_3^- e íons H^+ . A tensão de membrana modifica a conformação de algumas proteínas membranaais, permitindo o intercâmbio de íons com o meio extracelular. O Ca^{++} ingressa no espermatozóide e participa na regularização do início da ativação desencadeando a transdução de sinais e atuando como enzima efetora através da adenilato ciclase, reguladora do metabolismo do AMPc. O K^+ inibe a ativação dos espermatozóides em baixas concentrações e devido a isso, acredita-se que a inibição da ação do K^+ é regulada principalmente pelos íons Ca^{++} , devido ao fluxo simultâneo dos dois íons. A saída de K^+ favorece a abertura de canais de Ca^{++} e seu ingresso intracelular por sua vez, favorece a liberação de Ca^{++} intracelular armazenado e modifica o pHi (pH intracelular) produzindo-se o primeiro sinal Ca^{++} dependente e AMPc independente para o início da motilidade (COSSON et al., 1999).

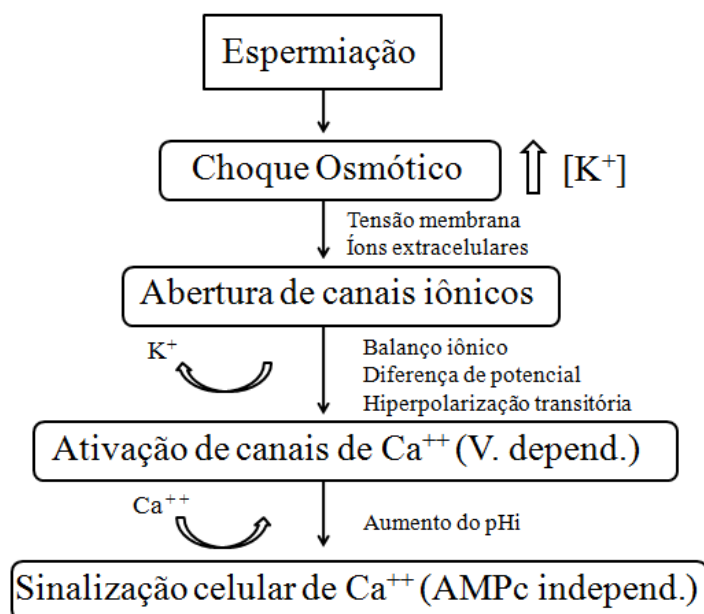


Figura 4- Ativação da motilidade (livremente adaptado de Cosson *et al.*, 1999)

A energia para a motilidade e o metabolismo básico do espermatozóide são derivados de uma quebra de nutrientes exógenos e endógenos na presença ou ausência

de oxigênio. Dados sobre o uso de oxigênio em espermatozóides de peixes de clima temperado são limitados (STOSS, 1983).

A diminuição da capacidade de natação dos espermatozóides é originada em parte pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (BILLARD, 1990b). Em espermatozóide de peixes, a fosforilação oxidativa mitocondrial, que é altamente requerida para produzir energia durante a locomoção, permanece insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (COSSON et al., 1999).

Em estudos realizados por Perchec et al. (1993) com sêmen de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), logo após a iniciação da motilidade, o ATP intracelular nos espermatozóides diminuiu rapidamente e sua regeneração ocorre espontaneamente dentro de 15 minutos. Lahnsteiner et al. (1993) verificaram que o espermatozóide de sêmen de truta arco-íris (*O. mykiss*) utiliza triglicérides e glicose como fonte primária de energia, mas o ATP continua sendo a fonte de energia mais importante para o batimento flagelar.

- pH

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. A modificação do pH intracelular por ação do Ca^{++} e outros componentes parecem ser necessárias no processo de ativação. A motilidade flagelar depende do pH intracelular numa faixa de 6.5 - 8.5, acima ou abaixo desses valores, há redução significativa (TABARES et al., 2005).

2.5. Resfriamento e Criopreservação seminal

O uso de gelo para a resfriamento do sêmen de peixes de clima temperado é uma prática antiga (BARRET, 1951; BILLARD; LEGENDRE, 1982; KAVAMOTO et al., 1987). Assim, há registros de sêmen de salmonídeos armazenado em caixa térmica de madeira com gelo, em temperaturas entre 2 a 8 °C por período de horas a dias (BARRET, 1951). O sêmen pode ser armazenado a 5 °C por períodos de poucos dias a várias semanas e a melhor estratégia é armazená-lo a fresco sem diluição (HARVEY; CAROLSFELD, 1993). Em alguns casos, crioprotetores (DMSO ou etilenoglicol) são

adicionados para preservação em temperaturas levemente abaixo de 0°C em estado líquido (STOSS et al., 1978). Os espermatozóides de peixes cultivados, mantidos em baixas temperaturas (ao redor de 4°C), têm um baixo metabolismo e podem ser conservados por alguns dias em diluidores apropriados sem mudanças significantes na qualidade. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a competição dos espermatozóides por O₂ e espaço. A preservação a curto prazo do sêmen é um método menos estressante para prolongar a viabilidade dos espermatozóides do que manter os peixes capturados em tanques de manutenção, garantindo assim aplicações para propagações artificiais de estoque de descendentes naturais (MARQUES, 2004).

Os espermatozóides de peixes cultivados, mantidos em baixas temperaturas (ao redor de 4°C), têm um baixo metabolismo e podem ser conservados por muitos dias em diluidores apropriados sem mudanças significantes na qualidade. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a competição dos espermatozóides por O₂ e espaço (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

A técnica de criopreservação fundamenta-se no congelamento de gametas em nitrogênio líquido, podendo ser preservadas por um período de vários anos. O primeiro trabalho de congelamento foi realizado por Blaxter em 1953 e viabilizou o cruzamento de duas espécies de arenque que desovam em épocas diferentes do ano. Com isso, originou-se um grande número de protocolos tanto para espécie de água doce como marinhas (SUQUET et al., 2000).

No Sul e Sudeste do Brasil, várias espécies de peixes de água doce tem sido relacionadas à criopreservação. Nesses trabalhos vários tipos de crioprotetores e diluentes foram testados, dos quais o dimetilsulfóxido 10% combinado com a glicose 5% e gema de ovo mostraram motilidades espermáticas acima de 50% (BEDORE, 1999; MURGAS et al., 2001, 2004, 2007; CAROLSFELD et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; MARIA et al., 2006).

2.5.1. Processo de congelamento

A técnica de congelamento celular pode ser dividida em três etapas: (1) As células são submetidas a uma solução crioprotetora (metanol, etileno-glicol, 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).

Uma situação balanceada que permita a sobrevivência pode dar-se quando a taxa de resfriamento seja o suficiente alta para minimizar o tempo de exposição à solução concentrada e, ao mesmo tempo, suficientemente baixa para minimizar a quantidade de gelo intracelular por abaixo do nível crítico ao criodano (SIERRA, 2005).

Segundo Hunter (1982), a viabilidade de espermatozóides congelados relaciona-se a fatores como: o diluente e a concentração de células; o agente crioprotetor adequado e sua concentração no meio, o tempo e a temperatura de equilíbrio, a natureza da curva de resfriamento, a natureza da curva de descongelação, a utilização de um meio de descongelação específico; o modo de eliminar o agente crioprotetor (dilução ou diálise).

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).

A geladeira de isopor consiste em uma caixa de polietileno de 50x30x30 cm, dentro da qual é adaptada uma rampa metálica separada do fundo 10 cm, onde a temperatura desejada se consegue colocando o nitrogênio líquido a certa altura e as amostras são congeladas só com o vapor do nitrogênio.

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.

Vários destes equipamentos foram testados em várias ocasiões, Riley et al. (2004) congelaram em câmaras frias a -140°C, com uma curva de 16°C/min, começando de -60°C, já que ao colocar as amostras a temperatura aumentou.

Cruz et al. (2004), usaram o vapor de nitrogênio líquido dentro de uma geladeira de isopor, colando uma rampa a 3 cm do fundo, estabilizando a temperatura a -76°C

durante 15 minutos colocando as amostras em palhetas de 0,5 mL congelou em um freezer programável a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -150°C , finalmente como a maioria de estudos depois de um tempo determinado as palhetas foram transferidas ao nitrogênio líquido a -196°C .

No Brasil, Maria (2005), congelou sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) dentro de um “dry shipper” a -170°C , a uma taxa de congelamento de $-35.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 24 horas.

2.5.2. Diluentes

Para o congelamento do sêmen há necessidade de adição de agentes crioprotetores e meios diluentes, sendo esses últimos, soluções de sais ou carboidratos, que adicionados ao sêmen, mantêm a viabilidade espermática durante a redução da temperatura. A composição do diluente é um dos fatores que afetam à proporção de espermatozóides vivos após a congelação-descongelação (WATSON, 1995).

Os diluentes para congelação devem possuir como requisitos básicos: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estabilidade, mantendo suas propriedades físico-químicas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozóides; esterilidade e servir de carreador de crioprotetores (LEGENDRE; BILLARD, 1982).

Segundo Maisse et al. (1998), os meios diluentes ideais compõem-se de uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo e que proteja as células contra o choque térmico que se produz ao resfriar o sêmen desde os 20°C aos 5°C : gema de ovo ou leite desnatado; uma fonte de energia: glicose ou frutose; um componente tampão: citrato de sódio ou tris-hidroximetil-aminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja aos espermatozóides durante a congelação: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol; açúcares como a lactose e rafinose, um antibiótico para prevenir o crescimento bacteriano: penicilina, estreptomicina ou gentamicina. Na maioria dos trabalhos, a combinação desses dois agentes (crioprotetores e diluentes) é diferente, sendo difícil saber qual o fator ideal para cada espécie, já que eles atuam de modo específico.

- Diluentes à base de água de coco para congelação e resfriamento

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (NUNES; COMBARNOUS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME; MARQUES Jr., 1994).

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal, obtendo-se bons resultados com a utilização da água de coco na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (SALLES, 1989), ovinos (ARAÚJO, 1990), suínos (TONIOLLI; MESQUITA, 1990) e caninos (MONTEZUMA Jr. et al., 1994).

A água de coco (*Cocos nucifera* L.) foi utilizada como diluente de sêmen de carpa (*Cyprinus carpio* L.) objetivando o prolongamento da motilidade espermática sendo comparada com a solução de Alsever modificada (cloreto de sódio 4,2g; citrato sódio 5%; ácido cítrico 0,5g; dextrose 20,50g; água destilada 1000 mL), ambos com a osmolaridade média de 150 mOsm/Kg, sendo observado melhores resultados quando do uso da água de coco (CARVALHO et al., 2002).

Farias et al. (1999) utilizou a água de coco “in natura” em quatro diferentes osmolaridades (100, 125, 150 e 300 mOsm/Kg) como diluente de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) em temperatura ambiente, observando que as osmolaridades de 125 e 150 mOsm/Kg aumentam a motilidade e sobrevivência espermática, em comparação com a água “in natura” (água do tanque).

Diluidores de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quando à conservação por longos períodos após sua extração do fruto, limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos. Isto motivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos a partir de sua desidratação em sistema alto-vácuo. O produto ACP se caracteriza por possuir composição padronizada, obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares as da água de coco *in*

natura. Para conservação do sêmen de peixes, a formulação ACP-104 foi desenvolvida (NUNES; SALGUEIRO, 2006).

2.5.3. Crioprotetores

Os crioprotetores são empregados no congelamento para diminuir os danos celulares produzidos pelo processo de congelamento-descongelamento e devem possuir baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (BATISTA et al., 2006).

São classificados em crioprotetores intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis. O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira água da célula e diminui a temperatura em seu interior, interferindo na formação de cristais de gelo (NIZIO, 2005).

Segundo Viveiros (2005) os crioprotetores que oferecem melhores resultados para o sêmen de peixes são: glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) e metanol, mostrando elevadas taxas de motilidade pós-descogelação e valores satisfatórios de percentuais de fecundação. Recentemente foi descrita a boa ação do metilglicol como crioprotetor de sêmen de piracanjuba (MARIA, 2005). Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser citados também, glicerol, metanol e etilenoglicol, geralmente a uma concentração de 10% (NIZIO, 2005).

Os crioprotetores extracelulares funcionam de forma diferente, eles recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana auxiliando a minimizar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. Incluem açúcares (sacarose, glicose), polímeros (dextrano, PVP) e proteínas (gema de ovo e leite em pó). A combinação de um crioprotetor intra e extracelular é muito empregada para a criopreservação (SIERRA, 2005).

2.6 Análise Computadorizada

A avaliação objetiva da motilidade espermática em peixes foi inicialmente relatado por Cosson et al (1985) com a utilização de um estroboscópio e câmera de vídeo gravando a motilidade espermática do sêmen de truta. Somente nos últimos anos um sistema de avaliação computadorizada foi adaptada para estudos espermáticos de peixes (CHRIST et al., 1996; KIME et al., 2001; RAVINDER et al., 1997). A Análise Espermática Auxiliada por Computador (Computer-Aided Sperm Analysis - CASA)

capta e digitaliza imagens estáticas e dinâmicas de espermatozóides através da utilização de um software (BOYER et al., 1989).

A Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA) é definida como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozóides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozóide e também resumos estatísticos da população espermática (AMANN; KATZ, 2004). A automatização desta análise permite maior objetividade e rapidez, uma vez que esta é realizada numa fração do tempo requerido pela avaliação subjetiva (MOTIMER, 1997).

Os sistemas CASA têm permitido a detecção de súbitas mudanças no movimento espermático, além de melhorar a discriminação a nível laboratorial de estudos com novos diluentes (AMANN; KATZ, 2004).

Os parâmetros comumente obtidos através de analisadores de sêmen computadorizados são: velocidade do percurso curvilíneo (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF), e deslocamento lateral da cabeça (ALH) (MOTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002)

Os três parâmetros de velocidade (VCL, VAP, VSL), são comumente utilizados para descrição geral do movimento do espermatozóide, entretanto, para uma avaliação adicional, foram estabelecidos os parâmetros STR, LIN e WOB, que tratam das relações entre estas velocidades (MOTIMER, 1997). A retilinearidade fornece uma indicação da relação entre o percurso líquido percorrido e a trajetória média do espermatozóide, de modo que em situações em que o percurso médio se aproxima da trajetória em linha reta apresente elevado STR, com baixa ALH. Ao contrário, percursos circulares possuem baixos STR, pois o percurso médio apresenta valores superiores que o retilíneo. A linearidade expressa a relação entre o percurso líquido percorrido pelo espermatozóide e sua trajetória real, de modo que uma trajetória circular pode apresentar baixa linearidade uma vez que o percurso real do espermatozóide é maior que seu deslocamento efetivo. A oscilação (WOB) apresenta-se baixa em percursos em que o espermatozóide percorre vasta área em seu deslocamento (elevado ALH), mas alto em trajetórias circulares ou retilíneas uma vez que a VAP e a VCL se assemelham (MOTIMER, 1997).

3. JUSTIFICATIVA

A espécie *Piaractus brachypomus*, a Pirapitinga, é uma espécie de importância comercial na região Nordeste, pela qualidade de sua carne. Pela diminuição na diversidade genética observada nos plantéis, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam o intercâmbio de material seminal entre os produtores, aproveitar os gametas que possam obter-se de indivíduos selvagens e conservar amostras seminais nos períodos menos favoráveis (FARIAS, 1998; FRENESDA et al., 2004).

Pouca informação existe sobre o sêmen de Pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (FRENESDA et al., 2004) principalmente em relação à composição do plasma seminal, comportamento em diversos meios diluentes e análise objetiva da motilidade durante a conservação, seja à fresco ou criopreservado. Além do mais, poucos testes foram realizados com o meio diluente à base de água de coco em pó para sêmen de peixes (ACP-104) e seu efeito durante o tempo de equilíbrio inicial, bem como o ajuste final no volume de meio diluente capaz de reativar os espermatozóides e oferecer bons resultados de fertilidade, compatíveis com sêmen fresco.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

O meio diluente à base de água de coco em pó para sêmen de peixes (ACP-104) apresenta íons e outros constituintes favoráveis à viabilidade espermática, podendo superar os resultados obtidos com outros diluentes, como o Ringer. O comportamento cinético dos espermatozoides, desde sua diluição a fresco até sua utilização, resfriado ou criopreservado, para uso na fertilização, é influenciado pela diluição em soluções iônicas e osmóticas em diversas concentrações.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

- Estabelecer e aperfeiçoar a utilização da água de coco em pó (ACP-104) como meio diluente para criopreservação sêmen de Pirapitinga.

5.2. Objetivos específicos

- Estudar o comportamento dos espermatozóides de Pirapitinga quando congelados em ACP-104 e Ringer, quando rediluídos em soluções de ativação em diversas concentrações pós descongelação;
- Avaliar a cinética espermática do sêmen pós descongelado de Pirapitinga em ACP-104 e Ringer.

6. CAPÍTULO 1

Cinética do sêmen de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-104) ou Ringer: pós-descongelção e ativação em diferentes soluções.

Nathalie Ommundsen Pessoa, Carmina Sandra Brito Salmito Vanderley, Míriam Luzia Nogueira Martins de Sousa, Mônica Aline Parente Melo, Claudio Cabral Campello, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, José Ferreira Nunes.

Submetido ao Periódico *Journal Canadien des Sciences Halieutiques et Aquatiques* em 25 de outubro 2009

Cinética do sêmen de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-104) ou Ringer: pós-descongelamento e ativação em diferentes soluções.

Cinetic analysis of cryopreserved sperm from Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) in diluents solutions based on coconut water powder (ACP-104) or Ringer: pos-thawed and activation in different activation solutions.

RESUMO

A pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), é um peixe da família Characidae, originário das Bacias do rio Amazonas e Orinoco. O objetivo desse trabalho foi determinar a motilidade espermática de sêmen criopreservado em diferentes diluentes de *Piaractus brachypomus* e a ativação da motilidade com três soluções de ativação. As amostras de sêmen foram diluídas em quatro meios preparados pela combinação dos dois diluidores ACP-104, água de coco em pó e Ringer associados à dois crioprotetores, DMSO e metilglicol. Os dados mostram o NaCl e o NaHCO₃ como soluções de ativação, apresentaram resultados semelhantes entre si e significativamente superiores à água destilada. O tratamento ACP-104 associado ao crioprotetor DMSO apresentou ativação da motilidade espermática pós-descongelamento significativamente superior em relação aos demais tratamentos. Conclui-se portanto que a água de coco em pó modificada para peixes mantém a motilidade dos espermatozóides viável e demonstra ser um bom diluente para a criopreservação do sêmen nessa espécie.

Palavras-chave: Criopreservação, *Piaractus brachypomus*, Peixe, Sêmen, Motilidade

ABSTRACT

The pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1818) is a Characidae freshwater fish that inhabits the Amazon and Orinoco River basins. The aim of this study was determinate spermatic motility of cryopreserved sperm of pirapitinga in three different activation solutions. Sperm samples were diluted in four freezing media prepared by a combination of two extenders ACP-104, coconut water poudner and RINGER modificado and two cryoprotectant agents (DMSO and methylglycol). Data shows NaCl and NaHCO₃ results were similar to each other and significantly superior to distilled water. The ACP-104 treatment associated with the cryoprotectant DMSO showed activation of sperm motility after thawing significantly higher compared to other treatments. In conclusion, therefore, the coconut milk powder modified to keep fish sperm motility feasible and proved to be a good diluent for sperm cryopreservation in this species.

Key-words: Cryopreservation, *Piaractus brachypomus*, Fish, Sperm, Motility

INTRODUÇÃO

A pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), é um peixe da família Characidae, 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 (Alcantara 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).

O sêmen pode ser congelado através do processo de criopreservação, que é uma técnica que envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozóides de peixes em nitrogênio líquido, mantendo a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (Mins et al., 2000). Diluidores são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células durante a refrigeração. As condições exigidas de um diluidor é que ele seja isotônico (que não ative a motilidade espermática), estável ao longo do armazenamento, estéril e também carreador de crioprotetores. (Maria et al., 2006)

A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (Blume e Marques Jr., 1994). A água de coco *in natura*, após corrigidos a osmolaridade e o pH para o sêmen da espécie respectiva, poderia representar um diluidor eficiente, com uma relação custo/benefício favorável aos programas de inseminação artificial no Brasil (Nunes e Cobarnous, 1995). O ACP foi testado inicialmente como diluidor de sêmen de caprino (Salgueiro et al., 2002), e mais recentemente na criopreservação de sêmen de peixes, como piracanjuba, curimba, piapara *Leporinus elongatus* (Viveiros et al., 2007). O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira a água da célula e diminui a temperatura na qual o interior da célula é congelado, diminuindo também na formação de cristais de gelo por outras formas desconhecidas. O DMSO é o crioprotetor mais utilizado na criopreservação do sêmen de peixes characiformes brasileiros. O DMSO têm sido efetivo na maioria das espécies quando utilizado numa concentração de 5-15% (Viveiros e Godinho, 2008). Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados também podem ser citados glicerol, metanol e etilenoglicol. Além desses, o

metilglicol também tem mostrado eficiência como crioprotetor (Viveiros e Godinho, 2008).

A avaliação da motilidade espermática em peixes tem progredido significativamente com a utilização de gravação de vídeos e análise de imagens (Iwamatsu et al., 1993; Trippel e Neilson, 1992) ou iluminação estroboscópia e microscopia de campo escuro (Cosson et al., 1985). Além dessas técnicas, o software CASA (analisador de motilidade espermática assistida por computador), que é amplamente usado para avaliar sêmen de aves e mamíferos, vem sendo usado em peixes e fornecendo parâmetros de motilidade espermática que poderiam estar relacionados a taxas de fertilização (Kime et al., 2001). O objetivo do presente estudo foi avaliar a motilidade espermática, utilizando o método computadorizado SCA (Sperm Class Analyser, 2005, Microptics, S.L. versão 3.2.0), do sêmen criopreservado de pirapitinga *P.brachypomus* em diferentes criodiluentes (ACP-104 e RINGER associado a DMSO ou Metilglicol) e a ativação da motilidade com 3 soluções de ativação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos meses de junho a setembro de 2009 no Centro de Pesquisas em Aquicultura (CPAq) do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) em Pentecoste (CE). Foram selecionados 30 machos de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) com rede de arrasto, em tanque de terra, os quais foram selecionados, identificados com microchip, pesados e injetados com dose única de extrato bruto de hipófise de carpa (2 mg/kg de peso corporal) para facilitar a coleta de sêmen, de acordo com o protocolo do CPAq. Após aproximadamente 14 horas da indução hormonal, o sêmen de cada macho foi coletado sob leve massagem da cavidade celomática no sentido crânio-caudal, individualmente em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação com água, sangue, fezes ou urina. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado em microscópio de luz previamente focalizado em aumento de 400x para verificar se apresentavam motilidade espontânea ou causada por contaminação. Nas 30 amostras sem motilidade espontânea ou contaminação, a motilidade espermática foi induzida com água do tanque na diluição de 1:10 (sêmen:ativador) e subjetivamente determinada através de uma escala de 0 a 100%. Em seguida, amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume e pH (YSY Meter 660). Durante esses procedimentos o sêmen foi mantido em tubos de ensaio em isopor com gelo ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).

Para o congelamento, foi feito 5 ‘pools’ do sêmen de 15 animais e diluídos em solução na proporção de 1:4 (sêmen:diluidor+crioprotetor) e 1:6 (sêmen:diluidor+crioprotetor). Os diluidores testados foram: água de coco em pó (ACP-104;pH 7,8 e 300mOsm) e Solução de RINGER modificada para peixes (NaCl, KCl, NaHCO₃, CaCl₂.2H₂O, pH 7,8 e 290-310 mOsm). Foi utilizado 10% dos crioprotetores DMSO ou metilglicol. O sêmen diluído foi então envasado em palhetas de 0,5 mL (n=9 palhetas/meio/macho) e congelado no botijão de vapor de nitrogênio (Cryoporter LN₂ dry vapor shipper), a -170°C. Após 30 minutos, as palhetas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (M.V.E., modelo Volta 20).

Após 12 dias de criopreservação, as amostras foram analisadas no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza – CE. Foram realizadas 5 repetições. No momento da descongelação, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C, por oito segundos (Maria et al., 2006). Cinco µL do sêmen descongelado de cada palheta foram adicionados na câmara de Makler e ativado por 3 soluções ativadoras, NaCl 50 mM (Maria et al., 2006), NaHCO₃ 1% (Murgas et al., 2007) e água destilada, e imediatamente observado no microscópio de contraste de fase (Nikon H550S) focalizado na objetiva de 40x, com filtro verde e ótica na posição pH1. O microscópio encontrava-se acoplado a uma câmera de vídeo que gera 25 imagens por segundo através das quais os parâmetros de motilidade foram calculados pelo Sperm Class Analyser (SCA 2005, Microptics, S.L. versão 3.2.0), que calculou os seguintes parâmetros: motilidade espermática (%), a velocidade curvilinear (VCL, µm/s), a velocidade média na trajetória (VAP, µm/s) e a velocidade linear (VSL, µm/s). Todos os dados estão expressos em média ± erro padrão da média. Os dados foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o software utilizado foi o SAS (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corpóreo e as características gerais do sêmen fresco dos 30 machos de pirapitinga estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Peso dos machos e características do sêmen fresco de pirapitinga (média $\pm$ erro padrão da média; n= 30)

Características	Média $\pm$ erro padrão
Peso corporal (kg)	2,8 $\pm$ 0,7
Motilidade espermática subjetiva (%)	95,0 $\pm$ 1,0
Volume de sêmen (mL)	1,8 $\pm$ 0,4
pH do sêmen	8,5 $\pm$ 0,0

Tabela 2- Motilidade espermática pós descongelação do semen criopreservado em ACP-104 e RINGER associados aos crioprotetores DMSO ou Metilglicol após ativação utilizando três soluções de ativação de motilidade.

Tratamentos	H ₂ O	NaHCO ₃	NaCl
ACP-104+DMSO10%	3,76 $\pm$ 1,7Ba	16,28 $\pm$ 2,6Aa	21,13 $\pm$ 2,6Aa
ACP-104+MG10%	2,16 $\pm$ 0,6Ba	7,97 $\pm$ 2,5Aab	9,46 $\pm$ 2,6 Ab
RINGER+DMSO10%	3,49 $\pm$ 1,5Ba	9,39 $\pm$ 3,4Aa	5,73 $\pm$ 3,1ABb
RINGER+MG10%	3,97 $\pm$ 3,5Aa	3,42 $\pm$ 0,9Ab	2,86 $\pm$ 1,7Ab

^{a-b; A-B} Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos e letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre soluções de ativação. (P<0.05)

Na tabela 2, quando a água destilada foi usada como solução ativadora, observa-se que não houve diferenças significativas independente dos tratamentos. Quando o bicarbonato foi usado como ativador, os tratamentos com DMSO apresentaram resultados significativamente superiores ao Ringer-metilglicol. Já o ACP-metilglicol foi equivalente para todos os tratamentos. Quando o NaCl foi utilizado observou-se resultados significativamente superiores no tratamento ACP-DMSO em relação aos demais tratamentos. Na comparação entre os tratamentos, o ACP-DMSO e ACP-metilglicol se comportaram da mesma forma quando ativados por bicarbonato e NaCl, significativamente superiores à água destilada. No tratamento Ringer-DMSO o ativador bicarbonato apresentou resultado significativamente superior em relação à água e o NaCl similar as duas soluções ativadoras. Já o tratamento Ringer- metilglicol se comportou da mesma forma independente da solução ativadora.

Em relação aos parâmetros do CASA, a velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), a velocidade média na trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$) e a velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), também não houve diferenças significativas entre os tratamentos e as soluções de ativação.

O NaCl têm sido um bom ativador de motilidade de sêmen de pirapitinga de acordo com a literatura, o que corrobora os bons resultados encontrados nesse trabalho (FRENESDA et al, 2004; NAVARRO et al, 2004). O Bicarbonato apresentou bons resultados na ativação de sêmen de curimba (FELIZARDO et al, 2009). E a água destilada provavelmente não apresentou bons resultados de ativação por não ser iônica e apresentar osmolaridade zero.

Segundo Viveiros (2007), O ACP tem sido utilizado com sucesso na criopreservação de sêmen de animais domésticos e o ACP-104 tem apresentado também bons resultados na criopreservação de algumas espécies reofílicas. O diluente RINGER foi modificado para sêmen de peixe em 1967 por Hudson e apresentou bons resultados no resfriamento do sêmen de Pirapitinga (VELASQUEZ, 2008), entretanto parece não ser eficiente em temperaturas de criopreservação.

Em relação aos crioprotetores, o DMSO se mostra efetivo na maioria das espécies numa concentração de 5 a 15%. (VIVEIROS; GODINHO, 2009) e apesar de não ter tido resultados significativos nesse trabalho, o metilglicol mostrou eficiente na criopreservação de curimba e piracanjuba (MARIA et al, 2006).

Os baixos resultados encontrados neste trabalho podem ser parcialmente explicados pelas coletas terem se dado durante o período ainda estava sobre o efeito de grande quantidades de chuva. No primeiro semestre de 2009, o Estado do Ceará registrou índice pluviométrico de 986mm, que significa 59% acima da média na mesma época do ano de 2008 (FUNCEME, 2009). Com qualidade de água ruim, e a uma deficiência na alimentação animal a que os animais estavam expostos, estes podem ter influenciado na motilidade espermática, pois o ciclo reprodutivo dos peixes teleósteos apresenta uma estreita relação com as variações de temperatura e com o regime de chuvas (BARBIERI et al., 2000; GODINHO, 2007). Considerando que esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, pode se afirmar que mesmo não existindo diferenças significativas, os mesmos podem ser utilizados para processamento da criopreservação do sêmen de pirapitinga para a constituição de banco de germoplasma. Conclui-se portanto, que a água de coco em pó modificada para peixes (ACP-104) mantém a motilidade dos espermatozoides viável e demonstra ser um bom diluente para a criopreservação do sêmen nessa espécie.

É necessário o aprimoramento das técnicas de manipulação da reprodução além de fatores abióticos, para que se obtenha o maior qualidade espermática e assim preservar as espécies em cativeiro. Essas informações poderão nortear novos experimentos, melhorar as condições de cultivo, valorizar a atividade no sentido econômico, assim como aumentar o número de alevinos destinados à aquicultura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à FUNCAP, pelo apoio financeiro; ao Centro de Pesquisa de Aqüicultura (CPAq) do DNOCS (Pentecoste) pela estrutura e suporte técnico e ao Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará.

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). *Cien. Agron.* v.21, p.43–49, 1990.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatã, *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). *Acta Limnologica Brasileira*, v.12, p.85-91, 2000.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.18, p.97-104, 1994.

COSSON M.P., BILLARD R., GATTI J.L., CHRISTEN R. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*. v.46, p.71–75, 1985.

FELIZARDO, V. O. ; MURGAS, L. D. S. ; NAVARRO, R. D. ; GONÇALVES, A. C. S. . Osmolaridade dos Ativadores e Taxa de Diluição na Ativação do Sêmen Criopreservado de Curimba (*Prochilodus lineatus*). In: IV CONGRESSO DE EXTENSÃO DA UFLA, 2009, LAVRAS. IV CONGRESSO DE EXTENSÃO DA UFLA, 2009.

FRESNEDA A.; LENIS G.; AGUDELO E.; OLIVERA-ÁNGEL M. Espermiação inducida y criopreservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. v.17, p.46-52, 2004.

FUNCEME. Avaliação da previsão e estação chuvosa de 2009, 2009. Disponível em <<http://www.funceme.br>> Acessado em: 21 set 2009.

GODINHO H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.31, p.351-360, 2007.

IWAMATSU, T.; ISHIJIMA, S.; NAKASHIMA, S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. *Exp. Zool.* v.266, p.57–64, 1993.

KIME D.E.; VAN LOOK K.J.; MCALLISTER B.G.; HUYSKENS G.; RURANGWA E.; OLLEVIER F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* v.4, p.425-33, 2001.

MARIA, A.; VIVEIROS, A.T.M.; FREITAS, R.; OLIVEIRA, A. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v.260, p.298-306, 2006.

MINS, S.D.; TSVETKOVA, L.I.; BROWN, G.G. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Ed). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.123-129.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FREITAS, R; PEREIRA, J. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Rev. Bras. Zoot.**, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

NAVARRO, O.J.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y.M.; CRUZ-CASALLAS, P.E., Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). *Rev. Col. Cienc. Pec.* v.17, p.53–59, 2004.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza.

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. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.5, p.96-98, 2002.

VÁSQUEZ-TORRES W.; PEREIRA M.F. 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.

VELASQUEZ, S.P. *Criopreservação do sêmen de Pirapitinga Piaractus brachypomus*(Pisces, Characidae).2008. 96f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Marinhas Tropicais), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

VIVEIROS A.T.M.; MARIA A.N.; ORFAO L.H; CARVALHO M.A.M.; NUNES J.F. Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: 8TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, Saint Malo, France, 2007, p.232.

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

WEERD JH VAN.; SUKKEL M.; RICHTER C.J.J. An analysis of sex stimuli enhancing ovarian growth in pubertal African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. v.75, p.181-191, 1990.

7. CONCLUSÃO

A água de coco em pó modificada para peixes mantém a motilidade dos espermatozóides viável e demonstra ser um bom diluente para a criopreservação do sêmen nessa espécie.

8. PERSPECTIVAS

A criação em cativeiro de animais reofílicos é um dos fatores que provocam alterações bioquímicas nos animais. Pelo valor econômico da aquicultura, pesquisa e extrativismo, há ainda grande necessidade de aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação de gametas abrangendo todos os eventuais estresses climáticos para otimizar a produção e poder promover um banco de germoplasma de animais resistentes a condições aversas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco “in natura” adicionada de gema de ovo como diluente do sêmen caprino. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.1, p.39-49, 1990.

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.

BARRET, I. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. **J. Fish Res. Bd. Can.**, v.8, n.3, p.125-133, 1951.

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.

BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 53p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Celular).

BILLARD, R., LEGENDRE, M. Conservation a court terme des gamètes de truite arc-en ciel en condition *in vitro* sous atmosphère d' oxygene. **Bull. Fr. Piscic.**, v.284, p.162-167, 1982.

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, 1990a. Chapter 9, p.870-887.

BILLARD, R. La motilité du spermatozoïde de poisson : aspects énergétiques. In: V JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 1990b, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza, Espagne, p.163-186.

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, 1990c. Chapter 3, p. 183-213.

BILLARD, R.; COSSON, M.P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122-131, 1992.

BLUME, H.; MARQUES JR., A.P.V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p.97-104, 1994.

BOYER M., ROUSTAN C., BENYAMIN Y. DNase I—actin complex: An immunological study. **Bioscience Reports**. v.5, p.39–46, 1989.

CAROLSFELD J.; GODINHO H.P.; ZANIBONI FILHO, E. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489, 2003.

CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F.; GONDIN, J.M. Prolongamento da motilidade espermática de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Cocos nucifera* L.) como diluidor de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.5, 2002.

COSSON M.P., BILLARD R., GATTI J.L., CHRISTEN R. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. **Aquaculture**. v.46, p.71–75, 1985.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chapter 16, p.162-186.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de Peixes de Água Doce**. Jaboticabal - FUNEP. 189p. 1992.

CHRIST, S. A., TOTH, G. P., MCCARTHY, H. W., TORSELLA, J. A. & SMITH, M. K. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Fish Biology**.v.48, p.1210–1222, 1996.

CRUZ, P.; PARDO, S.; ARIAS, J.; LOMBO, P.; LOMBO, D.; PARDO, J. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. **Jour. World Aquac. Soc.**, v.35, n.4, p.529-534, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization. **World fisheries production by capture and aquaculture, by country**. Disponível em: http://www.fao.org/fi/website/FIetri_eveAction.do?dom=topic&fid=3459. Acesso em: 15.set.2009.

FARIAS, I.P. Molecular Phylogeny of Neotropical Cichlids: The Relationships of Cichlasomines and Heroines. In Malabarba L. Reis R (ed). **Proceedings: International Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 499– 508.

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

FONSECA, V.O.; VALLE FILHO, F.R.; ABREU, J.J.; MIES FILHO, A. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 69 p., 1992.

FRESNEDA, A.; GUSTAVO. A.; AGUDELO, E.; ÁNGEL, M. Espermiación inducida y criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Rev. Colomb. Cienc. Pec.**, v.17, p.46-52, 2004.

GODINHO, H. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, n. 203, p.16-20, 2000.

GODINHO, H.; AMORIN, V.; PEIXOTO, M. Criopreservação do sêmen de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*, varo chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1537-1543, 2003.

GONZÁLEZ O.E.; DÍAZ J.; LARA R.. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales de importancia económica y comercial de la orinoquia colombiana (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*), Fase 1: Proyecto del CIC UJTL- INPA, 1998.

GONZÁLEZ O.E.; FRESNEDA A. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales de importancia económica y comercial de la orinoquia colombiana (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*), Fase 2: Proyecto del CIC UJTL- INPA, 2000.

GOREN A.; GUSTAFSON H.M.; DOERING D.S. Field trials demonstrate the efficacy and commercial benefit of a GnRH α implant to control ovulation and spermiation in salmonids. In: Goetz R, Thomas P, editors. **REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH**. The University of Texas, Austin, USA. p. 1-4.1995.

HARVEY, B., CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B., CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa, Ontario: International Development Research Centre: 1993. Chapter 7, p.119-130.

HOUSSAY B.A. Accion sexual de la hipofisis en los peces y reptiles. **Rev Soc Arg Bio**. v.106, p. 686-688, 1930.

HUDSON, R. C. L., A Ringer solution for *Cottus (teleost) fast muscle fibres*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, V. 25, n. 2, p.719-725, 1967.

HUNTER, R.H.F. **Fisiologia e Tecnologia da Reprodução da Fêmea dos Animais Domésticos**. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.

ITOH H., SUZUKI K., KAWAUCHI H. The complete amino acid sequences of α . Subunits of chum salmon gonadotropins. **Gen Comp Endocrinol**. v.78, p.56-65, 1990.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W., RIGOLINO, M. G., TABATA, Y. A., CAMPOS, B. DO E. S. DE C. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. **B. Inst. Pesca**, v.14 (único), p.51-62, 1987.

KIME D.E.; VAN LOOK K.J.; MCALLISTER B.G.; HUYSKENS G.; RURANGWA E.; OLLEVIER F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v.4, p.425-33, 2001.

KRASZNAI, Z.; MÁRIÁN, T.; BALKAY, L.; GÁSPÁR Jr. R; TRÓN, L. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Aquaculture**, v.129, p.123-128, 1995.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reprod. Nutr. Dev.**, v.33, p.349-360, 1993.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.15, n.2, p.167-179, 1996.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquat. Living Resour.**, v.9, p.59-80, 1996.

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).

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.

MARIA, A.N., **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba(*Brycon orbignyanus*)** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 84p. (Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia).

MARIA, A; VIVEIROS, AT.M.; FREITAS, R.; OLIVEIRA, A Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, n.260, p.298-306, 2006.

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 47, n. 5, p.799-804, 2004.

MELLINGER, J. **Sexualité et Reproduction des Poissons.** CNRS Editions, Paris, FR, 2002.

MELO, F.; GODINHO, H. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Anim. Reprod.**, v.3, n.3, p.380-385, 2006.

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.

MURGAS, L.; GUALHANONE, A; SILVA, M.; MELLO, C.; FREITAS, R; ZANGERONIMO, M. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post descongelación, **An. Vet. Murcia**, v.17, p.3-10, 2001.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FRANCISCATTO, R; MARIA, A. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Rev. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FREITAS, R; PEREIRA, J. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Rev. Bras. Zoot.**, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

MONTEZUMA Jr., P.; VIANA NETO, C.; NUNES, J.F. Água de coco como diluidor de sêmen de cães In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, **Anais...** 1994.

MORALES, J. **Acuicultura Marina Animal**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1986.670 p., il.

MORISAWA, M.; SUSUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, v.210, p.1145-1147, 1980.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

NASCIMENTO, A.F.; MARIA, A.N.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.M.; VIVEIROS, A.T.M. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*. 2009. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.002

NIZIO, A.M. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 15, n. 4, p. 399-421, Nov. 2005.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. . A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 43, p.58-60 2006.

OLIVEIRA, A. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

PERCHEC, P.G.; COSSON, J.; ANDRÉ, F.; BILLARD, R. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). **J. Appl. Ichthyol.**, v.9, p.129-149, 1993.

PIIRONEN, J.; HYVÄRINEN, H. Composition of the milt of some teleost fishes. **Journal of Fish Biology**, v.22, p.351-361, 1983.

RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMDAR, K.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Jour. Fish Biol.**, v. 50, p.1309-1328, 1997.

RILEY, K.; HOLLADAY, C.; CHESNEY, E.; TIERSCH, T. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquaculture**, v.238, p.183-194, 2004.

SALLES, M.G.F. **Água de coco (*Cocos nucifera* L.) “in natura” e na forma de gel e estabilizada como diluente de sêmen caprino**. Rio Grande do Sul: UFRS, 1989, 93p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária)

SIERRA, J. **Rendimiento de dos técnicas para la producción de peces nativos colombianos potenciales para la acuicultura**. 2005. 90f. Monografía (Curso em Biologia Marina) - Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 2005.

SILVA, J.M.A.; MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; PEREIRA, G.J.M.; NAVARRO, R.D.; MELLO, R.A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.3, p 668-677, 2009.

SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G.; TABATA, Y.A. Fertilidade do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 51-57, 1988.

SHERWOODE NM., WU S. Developmental role of GnRH and PACAP in a zebrafish model. **Gen Comp Endocrinol.** v.142, p.74-802, 2005.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; CRUZ, G.M.; SILVA, J.F.S.; GODINHO, H.P. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) hipofisado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p.248-250, 1999.

SOBRINHO, A.; SILVA, A.; MELO, F. Resultados de um experimento de policultivo da pirapitinga *Collossoma brachypomus* Cuvier, 1818, com o híbrido de tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Bol. Téc. DNOCS**, v.42, n.1, p.91-115, 1984.

SOMOZA G.M., MIRANDA L.A., STROBL-MAZULLA P., GUILGUR L.G. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. **Cell Mol Neurobiol.** v.22, p.589-609, 2002.

STOSS, J., BÜYÜKHATİPOĞLU, S., HOLTZ, W. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. **Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.**, v.18, n.4, p.1077-1082, 1978.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W.S. 1983.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquac. Res.**, n.31, p.231-243, 2000.

SUZUKI K., KAWAUCHI H., NAGAHAMA H. Isolation and characterisation of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. **Gen Comp Endocrinol.** v.71, p.292-301, 1988a.

SUZUKI K., KAWAUCHI H., NAGAHAMA H. Isolation and characterisation of subunits from two distinct salmon gonadotropins. **Gen Comp Endocrinol.** v.71, p.302-306, 1988b.

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

TADDEI, A.; BARBATO, F.; ABELLI, L. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultra structure and motility of untreated, prefreezing, and post-thawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). **Cryobiology**, v.2, p.244-255, 2001.

TANAKA, S.; ZHANG, H.; YAMADA, Y. Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. **Jour. Fish Biol.**, v.60, n, p.1134-1141, 2002.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, p.249-254, 1990.

TRIPPEL E.A.; NEILSON J.D. Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated spawning success. *Can J Fish aquat Sciences* v.49, p.2118-2127, 1992.

TVEDT, H.; BENFEY, T.; MARTIN-ROBICHAUD, D. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. **Aquaculture**, v. 194, n.1/2, p.191-200, 2001.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y.; MEDINA-ROBLES, V.; CRUZ-CASALLAS, P. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, v.256, p.264-271, 2006.

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

VIVEIROS, A.T.M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, v.73, n.3, p.1-9, abr, 2005.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.34, n.2, 2008.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.481-92, 2000.

WINKOOP A VAN., TIMMERMAN L.P.M., GOOS H.J.Th. Stimulation of gonadal and germ cell development in larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) by homologous pituitary extract. **Fish Physiol Biochem.**v.13, p.161-171, 1995.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. FAO/CODEVASF/CNPq. Brasília. 200p., 1983.

YARON Z., GUR G., MELAMED P., ROSENFELD H., ELIZUR A., LEVAVI-SIVAN B. Regulation of fish gonadotropins. **Int Rev Cytol.** v. 225, p.131-185, 2003.

YAO, Z.; CRIM, L.; RICHARDSON, G. Motility, fertility and ultra structural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus*) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, v.181, n.3/4, p. 361-375, 2000.

ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C.; LIU, X.Z.; XU, Y.Y.; WANG, C.L.; SAWANT, M.S.; LI, J.; CHEN, S.L. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, 60, p. 989-996, 2003.

10. ANEXOS

Anexo 1 – Níveis oficiais da água de coco em pó.

Dados provenientes de laudo de laboratórios REBAS ANVISA (2009), ITAL e CQA de Campinas.

Referendas ITAL/CQA (2009). Dados não publicados.

ACP Biotecnologia.

Por 100g	%VD Ref.	ACP (100g)
Caloriais (kcal)	2000	388
Caloriais (kJ)	8400	1630
Calorias de Carboidratos (kcal)		304
Calorias de Lipídios (kcal)		36
Calorias de Proteínas (kcal)		48
Carboidrato, por diferença (g)	300	76,000000
Frutose (g)		7,800000
Glicose (g)		6,200000
Sacarose (g)		0,000000
Proteína (g)	75	12,000000
Gorduras totais (g)	55	4,000
Gorduras saturadas (g)	22	2,460
8:0 ácido caprílico (g)		0,020
10:0 ácido cáprico (g)		0,020
12:0 ácido láurico (g)		1,410
14:0 ácido mirístico (g)		0,600
16:0 ácido palmítico (g)		0,420
<i>Gorduras monoinsaturadas (g)</i>		
18:1 ácido oléico (g)		0,120
<i>Gorduras polinsaturadas (g)</i>		<i>0,470</i>
18:2 ácido linoléico (g)		0,540
Gorduras trans (g)		0,000
Colesterol (mg)	300	0,000
Fibra, total alimentar (g)	25	24,000000
Fibra (g)		0,000000
Fibra Alimentar Insolúvel (g)		0,000000
Fibra Alimentar Solúvel (g)		0,000000
Umidade (g)		1,000000
Sódio, Na (mg)	2400	2240,000000
Cálcio, Ca (mg)	800	492,000000
Ferro, Fe (mg)	14	8,000000
Cobre, Cu (mg)	0,9	0,380000
Fósforo, P (mg)	700	430,000000

Magnésio, Mg (mg)	260	510,000000
Manganês, Mn (mg)	2,3	2,600000
Potássio, K (mg)		5170,000000
Selênio, Se (mcg)	34	27,100000
Zinco, Zn (mg)	7	3,300000
Vitamina B1 (mg), tiamina	1,2	4,550000
Vitamina B2 (mg), riboflavina	1,3	0,070000
Vitamina B3 (mcg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	16	3560,000000
Vitamina B6 (mg), piridoxina	5	0,130000
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	45	16,510000
Ácido Aspártico (mg)		4,729000
Ácido Glutâmico (mg)		12,412000
Alanina (mg)		7,627000
Arginina (mg)		1,883000
Fenilalanina (mg)		4,927000
Glicina (mg)		3,980000
Histidina (mg)		2,360000
Isoleucina (mg)	0,01	2,652000
Leucina (mg)	0,014	5,146000
Lisina (mg)		2,608000
Metionina (mg)		1,579000
Prolina (mg)		5,344000
Serina (mg)		2,543000
Tirosina (mg)		0,818000
Treonina (mg)		1,843000
Valina (mg)	0,01	5,234000