



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

SARAH RAQUEL PINTO ALVES

Caracterização e refrigeração de sêmen de *Prochilodus nigricans* da Baixada Maranhense

SÃO LUÍS- MA

2016

SARAH RAQUEL PINTO ALVES

Caracterização e refrigeração de sêmen de *Prochilodus nigricans* da Baixada Maranhense

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Erivânia Gomes Teixeira

SÃO LUÍS- MA

2016

Alves, Sarah Raquel Pinto.

Caracterização e refrigeração de sêmen de *Prochilodus nigricans* da Baixada Maranhense/ Sarah Raquel Pinto Alves.– São Luís, 2016.

55 f

Mestrado(Dissertação)- Curso de Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Prof^a. Erivânia Gomes Teixeira

1.Espermatozóide. 2.Preservação. 3.Biotecnologia. I.Título

CDU: 639.3.03

SARAH RAQUEL PINTO ALVES

Caracterização e refrigeração de sêmen de *Prochilodus nigricans* da Baixada Maranhense

Aprovada em _/_/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Erivânia Gomes Teixeira- UEMA
(Orientadora)

Prof^o Dr^a Raimunda Nonata Fortes Neta- UEMA

Prof^o Dr^a Marina Bezerra Figueiredo- UEMA

Dedico este trabalho:

Ao senhor meu Deus.

Aos meus pais, Ivaldo e Marinalva.

A minha irmã Raquel

Aos meus queridos avós.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Exemplar adulto de Curimatá, <i>Prochilodus nigricans</i>	18
Figura 2 -	Principais crioprotetores utilizado em peixes.....	22
Figura 3 -	Microrregião da Baixada Maranhense.....	23
Figura 4 -	Gabarito de uma câmara de Neubauer (a). Esquema de contagem de espermatozoides nos cantos e centro da câmara de Neubauer (b).....	26
Figura 5 -	Fotomicrografias de referência apresentando os defeitos morfológicos mais comuns em espermatozoides <i>Prochilodus scrofa</i> A) defeito na cabeça (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração na forma; B) peça intermediária em forma de saca rolha; C) defeitos na cabeça; D) espermatozoide sem cauda (seta) e E) peça intermediária em posição retro-axial.....	27
Figura 6 -	Espermatozoides de <i>Prochilodus nigricans</i> , (a) corado <i>kit</i> panótico fixado com citrato de sódio; (b) corado com rosa bengala, fixados com formol salino	30
Figura 7 -	Fotomicrografias apresentando os defeitos morfológicos mais comuns em espermatozoides de tilápia. A) defeito na cabeça (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração na forma; B) peça intermediária em forma de saca rolha; C) defeitos na cabeça; D) espermatozoide sem cauda (seta) e E) peça intermediária em posição retro-axial (KAVAMOTO <i>et al.</i> , 1999).....	35
Figura 8 -	Tempo de motilidade de sêmen do curimatá, <i>Prochilodus nigricans</i> , diluído e refrigerado em diferentes intervalos de tempo.....	37
Figura 9 -	Motilidade de sêmen do curimatá, <i>Prochilodus nigricans</i> ,diluído e refrigerado em diferentes intervalos de tempo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	1 – Avaliação e pontuação atribuída a cada critério para diferentes corantes utilizado na coloração de sêmen de <i>Prochilodus nigricans</i> capturados na Baixada Maranhense.....	25
Tabela 2 -	Soluções fixadoras combinadas à diferentes corantes para coloração do sêmen de curimatã, <i>Prochilodus nigricans</i> e suas respectivas pontuações.....	30
Tabela 3 -	Estatística descritiva das características seminais (n = 21) de curimatá , <i>Prochilodus nigricans</i> , capturadas na baixada maranhense.....	31
Tabela 4 -	Morfologia do espermatozoide de curimatá, <i>Prochilodus nigricans</i> capturadas na Baixada maranhense.....	36
Tabela 5 -	Motilidade (média \pm desvio padrão) do sêmen de curimatá, <i>Prochilloodus nigricans</i> diluído em diferentes soluções com crioprotetor DMSO durante 30 minutos.....	40

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois a toda honra e glória seja dada a ele.

Aos meus pais (Ivaldo e Marinalva) , pois eles que me deram toda estrutura pra chegar onde cheguei , não medindo esforços para ter bons estudos sempre e sempre me amando. Obrigada

À minha irmã Raquel, que mesmo sempre reclamando me ajudava em tudo que eu pedia.

À minha querida avó Tontonha pelo amor e carinho de todos os dias.

À minha orientadora Erivânia que me acompanha desde a graduação me incentivando sempre para alcance de novas conquistas.

Aos meus amigos Fabiana Nunes, Silvino Neto e Monielle Alencar que estão até hoje junto comigo, me apoiando, me incentivando e muitas vezes até brigando tanto na jornada acadêmica, profissional e pessoal.

À primeira turma do PPGRAP que em meio a muitos desafios conseguimos superar e fazer um bom trabalho.

Agradeço àqueles que, de uma ou outra forma, colaboraram para a concretização deste estudo.

OBRIGADA!!

RESUMO

Como objetivo este estudo visou caracterizar o sêmen de curimatá, *Prochilodus nigricans* e assim testar diferentes diluidores e crioprotetores a base de DMSO para utilização na sua conservação sob baixas temperaturas de espermatozoides. O sêmen foi coletado e analisado quanto a cor e textura através da observação direta. Para caracterização foi determinado percentual de espermatozoides moveis, motilidade, concentração, alterações morfológicas, pH e osmolaridade. Além disso foram realizados testes para determinar o corante dos espermatozoides mais adequado. As amostras foram divididas em duas porções e submetidas a dois tratamentos: T1 - sêmen diluído em formol-citrato e TII - sêmen diluído em Formol-salino tamponado sendo estes combinados com o corante rosa bengala ou o *kit* Panótico de Hemograma Instant- Prov. Para o teste de diluidores, as amostras de sêmen foram homogeneizadas com : glicose 5%, sacarose, NaCl 1,2%, ringer modificado para peixes, solução de Palma+ ACP e uma amostra controle com sêmen *in natura*. A partir de então os melhores resultados dos diluidores foram feitas combinações com o DMSO e assim feito os devidos testes. O *kit* Panótico de Hemograma Instant- Prov combinado ao fixador formol citrato pode ser utilizado com eficiência para corar sêmen de *P. nigricans*. O sêmen apresentou alta concentração espermática, porém com alta variação entre espécimes, baixo tempo de motilidade, quando mantido sob refrigeração o ringer é o diluidor adequado para utilização em protocolos de refrigeração. Em até 24 h o sêmen *in natura* apresentou resultados consideráveis, não necessitando de diluidor para sua conservação. O extrato liofilizado de palma forrageira + água de coco, combinado ao DMSO 10%, oferece menor toxicidade ao sêmen da referida espécie

Palavras-chave: espermatozoide, conservação, curimatá

LISTA DE SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
SCA	Sistema de análise de sêmen auxiliado por computador (<i>Sperm ClassAnalyser</i>)
SPZ	Espermatozoide
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
	2.1. Geral	16
	2.2. Específicos	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
	3.1. Espécies de estudo	17
	3.2. Caracterização espermática	18
	3.3. Refrigeração	20
	3.4. Crioprotetores	21
4	MATERIAL E METODOS	22
	4.1. Área de estudo	22
	4.2. Coleta de material	24
	4.3. Seleção do corante	24
	4.4. Caracterização do sêmen	25
	4.5. Refrigeração	28
	4.6. Teste de toxicidade	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
	5.1. Seleção de corante	29
	5.2. Caracterização espermática	31
	5.3. Refrigeração	36
	5.4. Toxicidade	39
6.	Conclusão	41
	Referências	42

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade extremamente rentável voltada a suprir uma crescente demanda por proteína animal, além de ser uma alternativa para minimizar os efeitos da sobrepesca sobre as populações naturais (FAO, 2009). A criação de peixes representa uma solução para a gradativa desaceleração da produção extrativista, uma vez que é realizada em ambientes reclusos e mais controlada, podendo assim proporcionar grande produtividade (PESSOA, 2009).

O pescado, principalmente os peixes oriundos da piscicultura, detém uma grande parcela da produção mundial de alimentos com comercialização em larga escala de diversas espécies. O cultivo de peixes é umas das maneiras mais econômicas de fornecimento de alimento rico em proteínas de alto valor biológico, e ainda permite a utilização de resíduos agroindustriais e de áreas não agriculturáveis (FAO, 2007).

O Brasil possui a mais rica fauna de peixes de água doce do mundo, com mais de 2.500 espécies nativas descritas, e muitas outras ainda desconhecidas (BUCKUP *et al.*, 2007). Entre essas espécies, pelo menos 40 têm sido tradicionalmente utilizadas ou apresentam potencial para aquicultura. As curimatás (*Prochilodus* sp.) são espécies muito produzidas no Brasil (CASTAGNOLLI, 1992), pertence ao gênero *Prochilodus* e são de grande importância comercial devido a possibilidade de adaptação em diferentes ambientes aquáticos (IHERING e AZEVEDO, 1981). Além de grande importância econômica, essas adaptações morfológicas e comportamentais observadas nas espécies do gênero *Prochilodus* (BOWEN, 1983) explicam a sua abundância e importância na cadeia alimentar em ambiente natural.

Os estoques pesqueiros não se recuperam rapidamente diante das mudanças ambientais causadas pela ação do homem, restando apenas o recrutamento para repor as perdas decorrentes da mortalidade por pesca (SANTOS-FILHO e BATISTA, 2009). A intensa degradação dos ambientes aquáticos, provocada por ações antrópicas constantes, tem afetado diretamente os estoques pesqueiros de espécies nativas como a curimatá, havendo a necessidade de estudos de dinâmica populacional para o desenvolvimento de técnicas de preservação da espécie. Neste sentido, a criopreservação seminal figura como importante ferramenta nas instalações de piscicultura (SILVA *et al.*, 2009).

A reprodução em cativeiro atua como alternativa para a manutenção dos estoques naturais, desenvolvimento aquícola, além da criação de pacotes tecnológicos

que visam à produção comercial (LÓPEZ, 2005), a conservação da biodiversidade em programas de repovoamento (CAROLSFELD *et al.*, 2003; VIVEIROS e GODINHO, 2009) e recrutamento dos estoques pesqueiros (AGOSTINHO *et al.*, 1995). A aquicultura tem por finalidade manter a integridade do sistema, contribuir para a criação de técnicas de conservação adequadas para peixes e permitir a diversidade genética.

O surgimento de novos métodos de manejo e conservação visa manter a variação genética aquática, através da manutenção do genoma das espécies ameaçadas de extinção e de animais que possuem alto valor exploratório na aquicultura (BALLOU, 1992; HAGEDOM *et al.*, 2012). Entre esses novos métodos está a conservação de gametas de peixes sob baixas temperaturas, que embora ainda incipiente, colabora de forma significativa para o crescimento da aquicultura (MENEZES *et al.*, 2008; SANCHES e CERQUEIRA, 2011) juntamente aos programas de reprodução existentes. As técnicas de conservação de sêmen visam, principalmente, facilitar o manejo, permitir a criação de bancos genéticos e aumentar a eficácia da reprodução (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A qualidade do sêmen tem relação direta com o sucesso da fertilização e conhecer suas características é essencial para reprodução (VIEIRA, 2010) e importante para formulação de tecnologias adequadas que permitam o sucesso reprodutivo. As linhas de pesquisas ainda estão muito limitadas a estudos de qualidade dos ovócitos, sendo poucos os trabalhos relacionados aos gametas do macho (RURANGWA *et al.*, 2004).

O esperma é considerado de boa qualidade quando tem capacidade de fecundar o ovócito (BOBE e LABBÉ, 2010) e suas variáveis físico-químicas podem causar alterações nessa habilidade de fecundação, direta ou indiretamente (FOGLI DA SILVEIRA *et al.*, 1988; RURANGWA *et al.*, 2004). Algumas características são extremamente importantes para o estudo de viabilidade seminal, como: concentração espermática, coloração, textura e volume, além da velocidade espermática, tempo de natação e percentual de células vivas (SALGUEIRO e NUNES, 1999).

Para se realizar a reprodução artificial, é possível utilizar o sêmen de três formas: fresco, resfriado ou congelado. Existem vantagens e desvantagens para cada método de processamento do ejaculado e cabe ao profissional responsável analisar os tipos que melhor atendem às exigências de cada caso (MAGNAGO, 2000). O uso do sêmen resfriado mantém um número de espermatozoides viáveis por um período de tempo maior, se comparado ao fresco, e seu tempo de processamento é menor em

relação ao congelado. Porém, a viabilidade espermática começa a diminuir após 24 horas de armazenamento, independentemente do diluente utilizado (SEVERO, 2009) Hoje no Brasil, mais de 17 espécies de peixes já têm seu protocolo de criopreservação de sêmen determinado, com especial destaque para as famílias Characidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Pimelodidae (CAROSFELD *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2004; VIVEIROS e GODINHO, 2009)

Diversas tecnologias referentes aos gametas de peixes irão servir de ferramenta para diminuir o desequilíbrio ecológico e aumentar os benefícios econômicos (TANAKA *et al.*, 2002); com isso promove-se o surgimento de programas de melhoramento genéticos e reprodutivos, bem como bancos de sêmen. Diante dessas necessidades, este trabalho objetivou adaptar protocolos para conservação de sêmen da curimatá (*Prochilodus nigricans*) capturadas na Baixada Maranhense, visto que esta espécie tem grande destaque no mercado maranhense e disponibilidade em aquiculturas, mercados, rios e riachos.

2 OBJETVOS

2.1. Geral

Fazer a caracterização e refrigeração do sêmen de *Prochilodus nigricans* da baixada Maranhense

2.2. Específicos

- Caracterizar o sêmen da curimatá (*Prochilodus nigricans*)
- Adptar protocolos de refrigeração do sêmen da referida espécie;
- Verificar a alterações na morfologia do espermatozoide.
- Avaliar o efeito tóxico criodiluidor sobre o espermatozoide;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. *Espécies de estudo*

Um gênero muito comum na região de estudo é o *Prochilodus*. Possui corpo alto, de coloração cinza prateada, com faixas transversais escuras e inconspícuas no dorso; as nadadeiras caudal, dorsal e anal apresentam várias manchas escuras e claras, alternadamente (UFAM, 2011).

a) Curimatá:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829.

Nome popular: curimbá, curimbatá, corimbatá, curimatã, curimatá, grumatã.

A família *Prochilodontidae* é composta por peixes de água doce de grande valor comercial, encontrado nas bacias da América do Sul, com exceção do Chile. Apresentam porte médio a grande (27- 44 cm) e estão entre as mais importantes na pesca continental, tanto comercial como de subsistências (CASTRO, 1991; LIZAMA, 2000). É uma espécie reofílica que migra vários quilômetros com finalidade de reprodução (GURGEL *et al.*, 2012).

Popularmente conhecida no Maranhão como curimatá, *Prochilodus nigricans* (figura 2) tem sua alimentação composta basicamente por detritos orgânicos e de perifíton (SANTOS *et al.* 1984). *Prochilodus nigricans* é encontrado na região centro norte do Brasil, nas bacias do Amazonas e Tocantins, e também à noroeste da América do Sul (Castro e Vari, 2004). Esta espécie é considerada a mais importante da várzea Amazônica (Mota e Rufino, 1997)

Figura 1. Exemplar adulto de Curimatá, *Prochilodus nigricans*



FONTE: do autor

Os curimatás buscam alimentos em níveis tróficos inferiores por serem detritívoros (BOWEN, 1983) As espécies do gênero *Prochilodus* tem sido consideradas iliófagas ou detritívoras, dependendo da região onde foram estudadas.

Os curimatás têm grande papel na produção da piscicultura comercial das regiões Norte e Nordeste do Brasil (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002) e são apreciados na culinária regional (MAIA *et al.*, 1999). Esta espécie é cada vez mais utilizada para a piscicultura semi-intensiva e intensiva e também como peixe sanitário, promovendo a limpeza de algas, bactérias e matéria orgânica acumuladas no cultivo (ZANIBONI FILHO, 2007). Devido seu crescente destaque na aquicultura e a necessidade de sua reprodução em cativeiro, estudos das suas características reprodutivas, tal como a caracterização espermática, são essenciais para o desenvolvimento de novas tecnologias.

3.2. Caracterização espermática

Na rotina das pisciculturas de alevinos, onde se utiliza a reprodução artificial, é essencial o conhecimento das características básicas do sêmen, o que implica no uso racional de gametas (BOMBARDELLI *et al.*, 2006a) e do número de reprodutores (FOGLI DA SILVEIRA *et al.*, 1985). Algumas espécies de peixes já apresentam suas características reprodutivas descritas num sentindo amplo, todavia não há muitos trabalhos que correlacione essas características quanto aos efeitos da sazonalidade nas

espécies reofílica de águas tropicais (KAVAMOTO *et al.*, 1986; SHIMODA *et al.*, 1999; ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 2001; SHIMODA, 2004; CRUZ-CASALLAS *et al.*, 2005).

A descrição do perfil espermático de peixes envolve características como: físicas (volume, turbilhonamento, motilidade, coloração, textura e concentração), químicas (pH, osmolaridade) e ainda as características morfológicas dos espermatozoides (FONSECA, 1992) que são fundamentais para estabelecimentos de protocolos de conservação de gametas.

Em estudos feitos por Rana (1995) e por Shangguan e Crim (1995) foram observados que as características seminais são extremamente variáveis entre espécies e espécimes, principalmente na sua composição química. As alterações destes parâmetros estão relacionadas ao ambiente, sazonalidade, estado de maturação reprodutiva, idade, fatores genéticos, agentes estressores e a própria estratégia reprodutiva. A principal variação entre espécimes refere-se ao comportamento do espermatozoide, como por exemplo: o início, duração e padrão da motilidade (COSSON *et al.*, 2000).

As diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídios (PERCHEC *et al.*, 1993; LAHNSTEINER *et al.*, 1996), açúcares e ácidos (PIIRONEN; HYVÄRINEN, 1983), que compõe o líquido seminal, são bem variáveis em indivíduos da mesma espécie e estas são responsáveis pelo metabolismo do sêmen. As características físicas e químicas, de modo geral, são distintas entre si, todavia os espermatozoides ficam imóveis e inativos dentro das gônadas, não importando a espécie, e são ativados com alteração da osmolaridade, característica comum a todas elas (CARNEIRO, 2007).

A motilidade espermática é uma das principais propriedades a serem estudadas, uma vez que os espermatozoides influenciam diretamente no aumento da taxa de fecundação (RURANGWA *et al.*, 2004). A duração da motilidade do espermatozoide deve ser suficientemente longa, para que, após o contato com a água, possa atingir os ovócitos no momento da fertilização (LENZ, 2014).

O líquido seminal, além de imobilizar os espermatozoides serve de proteção para a estrutura celular (COSSON *et al.*, 1999). Em peixes de água doce, o flagelo depois de ativado em meio aquoso, tem poucos segundos de natação e rapidamente se desorganiza perdendo movimento (BILLARD *et al.*, 1995). O ducto de liberação do sêmen é comum ao urinário, com isso a contaminação do material é frequente devido à ocorrência de jatos duplos no momento da espermiacção (NYNCA *et al.*, 2012).

Em geral a duração da motilidade não ultrapassa os dois minutos na maioria das espécies. A técnica de análise seminal é baseada numa escala objetiva ou subjetiva da motilidade que varia de zero a 100%, observada através de microscópio óptico entre lâmina e lamínula (FRIBOURG, 1966) ou por meio de *softwares* específicos. Um parâmetro importante para uma boa avaliação é a morfologia (HAFEZ, 2004; VALE-FILHO, 2001), pois ocorre modificações em sua forma, geradas por alterações de temperatura, pH e osmolaridade do sêmen (ALAVI; COSSON, 2005). Streit Jr *et al.*(2004) afirmaram que a contagem das anomalias na morfologia do espermatozoide contribui para otimização dos processos reprodutivos.

3.3.Refrigeração

Por razões econômicas e práticas, e para superar as dificuldades inerentes ao processo de congelamento, são ampliados os métodos de conservação do sêmen no estado líquido por meio da refrigeração, o que confere vantagens aos sistemas de produção extensivos (LEBOEUF *et al.*, 2000). A preservação de sêmen em curto prazo consiste em manter a viabilidade espermática por um período de horas ou dias, em temperaturas de refrigeração, para serem utilizados posteriormente na fertilização. Essa técnica facilita o manejo, dispensando a presença do macho no ato da fecundação e aumenta a eficácia da reprodução artificial nas estações de pisciculturas (OLIVEIRA *et al.*, 2007), já que desta forma o sêmen pode ser colhido e preservado para posterior utilização (CARNEIRO *et al.*, 2006).

O processo de refrigeração, no entanto, pode causar danos irreversíveis ao espermatozoide, em virtude do choque térmico, mas que podem ser minimizados pela lenta redução da temperatura do sêmen diluído (PICKETT e AMANN, 1993). Uma solução diluidora deve ser utilizada neste processo, pois a diluição enfraquece a competição dos espermatozoides por O₂ e diminui a densidade (CAROLSFELD e HARVEY, 1999). A composição do diluente é um dos fatores que afetam a proporção de espermatozoides móveis após a refrigeração, congelação ou descongelação (WATSON, 1995).

Uma das grandes metas da biotecnologia da reprodução de peixes é a de encontrar um bom diluente para o sêmen. Hafez (2004) sugere que um diluente deve ter as seguintes características: proporcionar nutrientes como fontes de energia, proteger os espermatozoides do efeito maléfico do frio, proporcionar um meio tampão, manter a pressão osmótica adequada, inibir o crescimento bacteriano, aumentar o volume do

ejaculado, proteger as células espermáticas sob-baixas temperaturas. Vale salientar que diluente de refrigeração não contém crioprotetor já que este é muito tóxico para os espermatozoides (VIEIRA, 2010).

Legendre e Billard (1980) afirmam que para um diluidor ser adequado necessita ter: isotonicidade, para que não haja ativação da motilidade espermática antes do momento desejado, preservando a energia para ser utilizada durante fertilização; equilíbrio, pois suas características não devem ser alteradas quando adicionadas ao sêmen; permitir rápida transferência de temperatura do meio externo; estéril, ou seja, ausência de organismos contaminantes e, além disso, servir como fonte nutritiva ao espermatozoide.

O sêmen de cada grupo de animais possui características próprias; portanto a composição do diluidor deve ser ajustada para as características seminais e adequada à da tecnologia de conservação empregada (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012). Os espermatozoides de peixes cultivados, mantidos sob refrigeração (ao redor de 4°C), têm seu metabolismo reduzido e podem ser conservados por vários dias, em diluidores apropriados sem causar alterações significantes na qualidade (PESSOA, 2009).

3.4.Crioprotetores

A criopreservação envolve a diluição do sêmen em uma solução crioprotetora que deve conter um diluidor, um crioprotetor intracelular e um crioprotetor extracelular para permitir o armazenamento adequado. Essas soluções visam garantir que as células espermáticas não sejam ativadas durante o armazenamento e também protegê-las das chamadas crioinjúrias, danos celulares causados pela sua exposição a baixas temperaturas (SUQUET *et al.*, 1993; BILLARD *et al.*, 2004). 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).

Os crioprotetores extracelulares como: os carboidratos, sacarose e proteínas são moléculas com grandes dimensões que não penetram na membrana celular (HOVATTA, 2005), e protege por intermédio da sua ligação às cabeças embrionárias (QUINN, 1985). Além disso, reduz o choque de osmolaridade e evita a desidratação fazendo o controle de entrada de água na célula (SHAW, 1993).

A partir da década de 80, estudos observaram que os efeitos tóxicos dos crioprotetores são obstáculos para criopreservação de qualidade (GODINHO *et al.*, 2003). Com isso novas substâncias vêm sendo testadas para proteger as células dos

efeitos das baixas temperaturas sem prejudicá-las. Teixeira (2013) relata os principais crioprotetores utilizados para peixes (figura 2).

Figura 2. Principais crioprotetores utilizado em peixes

Criodiluentes	Espécie	Referência
Glicose 5% + metanol + gema de ovo	<i>Oreochromis niloticus</i>	GODINHO; AMORIM; PEIXOTO (2003)
Frutose + Tris + metanol	<i>Cyprinus carpio</i>	HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI (2003)
Glicose + metanol + gema de ovo	<i>Salmo trutta caspius</i>	SARVI <i>et al.</i> (2006)
BTS®(Beltsville thawing Solution) - metilglicol NaCl 200 mM + DMSO	<i>Brycon nattereri</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2007)
Ringer + metanol	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	PAN <i>et al.</i> (2008)
Glicose 5% + metilglicol	<i>Prochilodus lineatus</i>	VIVEIROS <i>et al.</i> (2009a)
Sacarose + DMSO	<i>C. carpio</i>	IRAWAN; VUTHIPHANDCHAI; NIMRAT (2010)
ACP-104 + DMSO	<i>Colossoma macropomum</i>	LEITE <i>et al.</i> (2011)
Glicose 6% + DMSO	<i>Prochilodus magdalenae</i>	MARTÍNEZ; TARAZONA-MORALES; PARDO-CARRASCO (2012)

No congelamento de sêmen de peixes há diversos tipos de crioprotetores que oferecem bons resultados na conservação (VIVEIROS, 2005). Em peixes o DMSO (Dimetilsulfóxido) apresenta o menor efeito tóxico e não induz as alterações cromossômicas, mesmo em concentrações altas (GAYLOR, 2007). Dentre os crioprotetores mais utilizados, o metanol possui a maior capacidade de penetração na célula, no entanto também apresenta maior toxicidade exceto para o sêmen de tilápia-do-Nilo (MURGAS *et al.*, 2007). Em alguns casos, os crioprotetores são adicionados para auxiliar na preservação dos gametas em temperaturas levemente abaixo de 0°C, baixando o ponto de congelação e mantendo os fluidos em estado líquido (STOSS *et al.*, 1982).

4 MATERIAL E METODOS

4.1.Área de estudo

A microrregião da Baixada Maranhense está localizada a oeste da ilha de São Luís, no norte do Estado do Maranhão (01°59' – 4°00'S e 44°21' – 45°33'W), limitada ao norte pelo oceano Atlântico, ao sul pelas regiões dos Cocais, a oeste pela região da

pré-Amazônia e a leste pelo Cerrado. (Fig. 3). A referida região constitui um complexo ecológico que inclui diversos componentes, tais como: rios, lagos, estuários, agroecossistemas, campos naturais e, principalmente, um grande sistema de áreas inundáveis (SEMATUR, 1991). Parte da Baixada Maranhense tem uma extensão de 1.775.035,6 hectares e devido sua importância, foi estabelecida como Área de Proteção Ambiental (APA) a partir do Decreto nº 11.900 de julho de 1991.(MARANHÃO,1991)

Figura 3. Microrregião da baixada Maranhense



Inserida no bioma da Amazônia, a microrregião Baixada Maranhense encontra-se no setor oriental, sendo parte da Amazônia Legal brasileira. Possui o maior conjunto de bacias lacustres do Nordeste, incorporando uma complexa interface de ecossistemas, que abriga ricas fauna e flora, aquática e terrestre (ROTH, P.G.e SCOTT, 1986; IBAÑEZ *et al.* 2000). A microrregião abrange 21 municípios, são eles: Anajatuba, Arari, Bela Vista do Maranhão, Cajari, Conceição do Lago Açu, Igarapé do Meio, Matinha, Monção, Olinda Nova do Maranhão, Palmeirândia, Pedro do Rosário, Penalva, Peri Mirim, Pinheiro, Presidente Sarney, Santa Helena, São Bento, São João Batista, São Vicente Ferrer, Viana e Vitória do Mearim, segundo o IBGE (2010).

As bacias hidrográficas dos rios Mearim, Pindaré, Grajaú, Pericumã, Turiaçu e outros menores estão inseridos na Baixada Maranhense (IBAÑEZ, 2000). Esses rios transbordam anualmente e suas águas inundam as planícies da região. Os solos aluvionários de origem geológica recente conferem à região grande fertilidade e riqueza

biológica, sobretudo da fauna ictiológica (MUNIZ, 2007). Devido sua extensão e região que atravessa, o Mearim é considerado, junto com o Itapecuru, um dos rios de maior importância do Estado do Maranhão (SOARES, 2005).

Os municípios de Arari e Vitória do Mearim fazem parte da APA da Baixada Maranhense e estão inseridos na bacia hidrográfica do rio Mearim (Fig. 1). Esta rede hídrica ocupa uma área de 99.058,68 Km², sendo a maior bacia genuinamente maranhense com 29,84% da área total do estado (ANA, 2005), envolvendo 83 municípios, dos quais, 65 possuem sedes localizadas dentro da bacia (MARANHÃO, 2002). O rio Mearim é famoso pelo fenômeno das pororocas e, tradicionalmente, constitui-se em fonte de renda e de lazer para as populações ribeirinhas, que vivem diretamente da atividade pesqueira, agrícola e extrativista. A grande diversidade de espécies de peixes torna essa região detentora de um dos principais polos pesqueiros dulcícolas do estado, com espécies nativas de grande apreço local.

4.2. Coleta de material

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pesca e Ecologia e Aquática; e no Laboratório de reprodução animal da Universidade Estadual do Maranhão. Foram utilizados vinte (20) espécimes de curimatás (*P. nigricans*) adultas adquiridas em pisciculturas da Baixada Maranhense (Vitória do Mearim e Arari). Os peixes foram submetidos à biometria e em seguida abatidos por choque térmico. Foi utilizada a metodologia de Teixeira (2013), segunda a qual as gônadas foram colhidas, o sêmen foi coletado e estocado em microtubos com capacidade para 2mL, e imediatamente acondicionados sob refrigeração (4°C). Uma alíquota de 5µl do sêmen foi depositada sobre lâmina de microscopia e observada ao microscópio de luz para certificar a ausência de contaminação.

4.3. Seleção do corante

Dos espécimes capturados foram analisadas 7 (sete) exemplares dos quais foram retiradas amostras de sêmen para definir o melhor corante, adaptando o protocolo proposto por Teixeira, 2013. As amostras foram divididas em duas porções e submetidas a dois tratamentos: T1 - sêmen diluído em formol-citrato (3,94 g de citrato de sódio, 4mL de formaldeído e 100mL de água destilada) ; TII – sêmen diluído em Formol-salino tamponado (99mL de solução salina + 0,9g de NaCl para 100mL de água

destilada + 1mL de formol), seguindo proporção de 1:500 (sêmen/solução, respectivamente). Para corar os espermatozoides foram utilizadas quatro combinações. No corante rosa bengala o esfregaço foi feito pela deposição de 10µl do sêmen diluído em 3µl do corante, enquanto que para o *kit* Panótico de Hemograma Instant-Prov, uma alíquota (10µl) de cada amostra foi depositada sobre lâmina e após descanso de 5 minutos feito a imersão nas soluções do kit.

As combinações do fixador com o corante totalizaram 28 lâminas analisadas em microscópio ótico (aumento de 40x). Foi avaliada a eficiência dos corantes conforme metodologia proposta por Streit-Jr *et al.* (2004), que estabelecem escores seguindo notas e pontuações conforme a tabela 1. Para cada lâmina somou-se os escores atribuídos às variáveis analisadas de acordo com a fórmula: $\Sigma =$ Alteração anatômica dos espermatozoides + Aglutinação + Eficiência do corante + Sujidade. As anormalidades morfológicas observadas, de acordo com Kavamoto *et al.* (1999) foram quantificadas.

Tabela 1 – Avaliação e pontuação atribuída a cada critério para diferentes corantes utilizado na coloração de sêmen de *Prochilodus nigricans* capturados na Baixada Maranhense.

CRITÉRIO	AValiaÇÃO	PONTUAÇÃO
Alteração anatômica e aglutinação	Sim	0 ponto
	Não	3 pontos
Eficiência do corante	Boa	3 pontos
	Regular	1,5 pontos
	Ruim	0 ponto
Sujidade	Baixa	1 ponto
	Suja	0 ponto

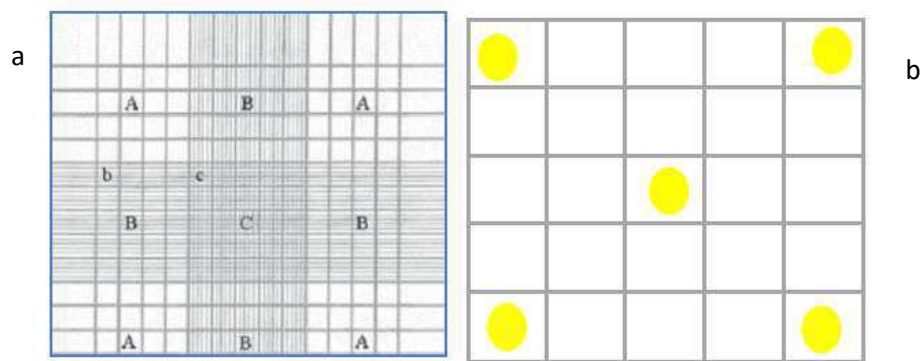
Adaptada de Streit-Jr *et al.* (2004).

4.4. Caracterização do sêmen

As amostras de sêmen dos 20 espécimes foram conduzidas ao laboratório e os parâmetros analisados foram: a cor e textura através da observação direta, conforme metodologia de Mojica (2004); o volume do sêmen (µL) mensurado com auxílio de micropipeta com volume variável. As amostras foram transferidas para um microtubos e o volume foi registrado. Para definir a concentração espermática (número de espermatozoides por mL de sêmen). As amostras foram diluídas em 1mL de solução formol-citrato na proporção de 1:50 (sêmen: solução formol citrato). Utilizou-se 10 µL dessa solução que foi transferida para a câmara hematimétrica de Neubauer e focalizada ao microscópio com aumento de 400X. A contagem dos espermatozoides foi feita no

quadrado de contagem C do gabarito da câmara, nos cantos e no centro de cada retículo (Figura 4) segundo Teixeira (2013).

Figura 4. Gabarito de uma câmara de Neubauer (a). Esquema de contagem de espermatozoides nos cantos e centro da câmara de Neubauer (b).



Fonte: Teixeira (2013)

O número de espermatozoides foi determinado segundo Tiba *et al.* (2009) e os resultados expressos em espermatozoides/mL⁻¹, seguindo-se a seguinte formulação:

$$CE = N \times F_c$$

Onde:

CE = concentração de espermatozoides por mm³;

N = número de células contadas na câmara de Neubauer;

F_c = fator de correção, que foi calculado como:

$$F_c = \frac{q \times fd}{d}$$

Em que:

q = 5, razão entre o número total de quadrados da câmara de Neubauer e o número de quadrados de realização da contagem (25/5);

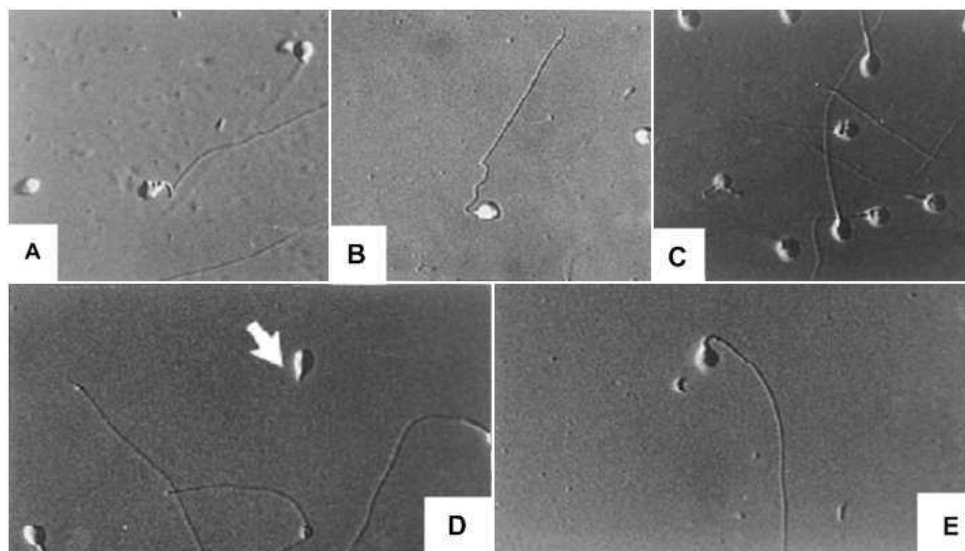
fd = diluição da alíquota de sêmen;

d = 0,1 mm (profundidade da câmara de Neubauer).

O pH do sêmen foi analisado através com fita indicadora e a osmolaridade do líquido seminal (mOsm/kg), por meio da leitura em osmômetro digital, modelo Osmette Com capacidade de leitura em volume de 200 μ L.

Para determinação do tempo de motilidade, 2 μ L de cada amostra de sêmen foi colocado sobre lâmina e ao microscópio óptico (40X) após ativação com 20 μ L de água destilada; o tempo da motilidade foi cronometrado do início da ativação até o momento em que todas as células se tornaram imóveis. Das mesmas amostras também foi determinada porcentagem de espermatozoides móveis, imediatamente após a ativação. Para os parâmetros da morfologia do espermatozoide, de cada espécime foram analisadas três lâminas e observados 150 espermatozoides. As anormalidades morfológicas (figura 5) foram registradas e quantificadas de acordo com a metodologia de Kavamoto *et al.* (1999).

Figura 5. Fotomicrografias de referência apresentando os defeitos morfológicos mais comuns em espermatozoides *Prochilodus scrofa* A) defeito na cabeça (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração na forma; B) peça intermediária em forma de saca rolha; C) defeitos na cabeça; D) espermatozoide sem cauda (seta) e E) peça intermediária em posição retro-axial.



Fonte: Kavamoto *et al.*(1999)

4.5. Refrigeração

Foram realizados seis tratamentos, com cinco repetições, referentes as soluções diluídas abaixo:

- a) Glicose 5% (350 mOsm/kg) - 6,3 g glicose + 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,9.
- b) Sacarose (330 mOsmol/kg)- 10,26 g sacarose + 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,5.
- c) NaCl 1,2% (300mOsm)- 14,6 g de NaCl+ 100 mL de água destilada
- d) Ringer modificado para peixes (NaCl, 6,5g/L; KCl, 3,0 g/L; NaHCO₃, 0,2 g/L; CaCl₂.6H₂O, 0,3 g/L; pH 7,8 e osmolaridade 300 mOsm/kg (RANA, 1995);
- e) Solução de Palma+ ACP (250 mOsm/kg)- ACP-104 tamponado + 100mL de água destilada +extrato liofilizado de palma forrageira, com pH 7,8
- f) Controle- sêmen *in natura*

A diluição do sêmen foi feita na proporção de 1:4 (sêmen/diluyente), com 50µL de sêmen e 200 µL do diluyente. Estes foram acondicionados em microtubos e estocados sob refrigeração (4°C), a motilidade foi registrada imediatamente após a diluição (0 h) e 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 40 e 42 horas após refrigeração, mediante utilização de microscópio ótica. Para a análise da motilidade, 2 µL da amostra foram colocados em lâmina de vidro com adição de 15 µL de solução de ativação (água destilada).

4.6. Teste de toxicidade

Foram testados três criodiluidores elaborados da seguinte forma:

- a) DMSO 10% (10mL) +100mL de NaCl
- b) DMSO 10% (10mL) + Ringer modificado para peixes (RANA, 1995)
- c) DMSO10% (10mL) + Solução de Palma com ACP (250 mOsm): ACP-104 tamponado + de água destilada + extrato liofilizado palma forrageira + 10% de DMSO

Foram delineados quatro tratamentos com 4 repetições.. Os tratamentos consistiram da adição dos criodiluidores ao sêmen *in natura*, conforme o seguinte: DMSO + NaCl+ sêmen (T1), DMSO + Ringer + sêmen (T2) e DMSO + Solução de Palma com ACP + sêmen(T3) e um tratamento sem adição de soluções , apenas o

sêmen *in natura* (T4). A proporção sêmen/criodiluidor foi de 1:5 composto por 50 µL de sêmen e 250µL do criodiluidor. Os tratamentos foram estocados em rack e acondicionados sob-refrigeração (4°C). O efeito tóxico foi avaliado por meio da porcentagem de espermatozoides ativos e o tempo de motilidade segundo metodologia descrita anteriormente. As avaliações foram realizadas imediatamente após a diluição (0 min.), 10, 20 e 30 minutos após a refrigeração.

4.7. Análise estatística

Os dados foram expressos em médias ± desvio padrão. As médias foram analisadas pela Análise de Variância (ANOVA), e quando encontradas diferenças significativas entre as médias foi aplicado o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa BIOESTAT versão 5.3 em nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de corante

Para o sêmen fixado em formol salino com o corante rosa bengala, o escore obtido foi 2,5 e quando o fixador foi formol citrato, o escore foi de 6,0 (tabela 2). Portanto a utilização de rosa bengala como corante para o espermatozoide de curimatá é viável quando o mesmo for fixado em formol citrato. De acordo com Streid Jr. *et al.* (2004) o corante rosa bengala deve ser utilizado somente mediante utilização do formol citrato como fixador, como verificado neste trabalho.

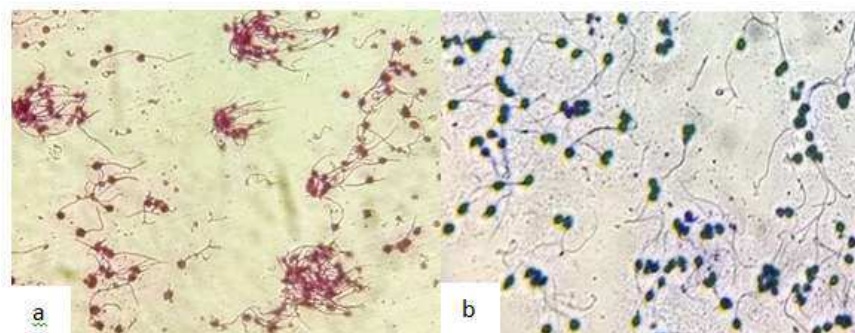
O corante que ofereceu melhor resultado para coloração do sêmen de curimatá foi à combinação de formol citrato com o *kit* panótico mediante imersão de 120 minutos com escore total de 7,0. Teixeira, (2013) utilizou, com sucesso, o panótico humano para coloração de espermatozoides de tilápia. Esse corante foi utilizado também para outras espécies como: carpa comum, *Cyprinus carpio* (LINHARES *et al.*, 2012) e pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (MELO, 2010).

Tabela 2. Soluções fixadoras combinadas à diferentes corantes para coloração do sêmen de curimatã, *Prochilodus nigricans* e suas respectivas pontuações

TRATAMENTOS	ROSA BENGALA	KIT PANÓTICO	
		30s	120 s
FORMOL SALINO	2,5	6,0	4,0
FORMOL CITRATO	6,0	5,5	7,0

Ainda sobre o formol citrato combinado ao *kit* panótico imerso por 120s, as alterações morfológicas observadas foram de 10,1%, sem aglutinação e baixa sujidade (Figura 6a). Porém, quando essas observações foram feitas para as combinações com rosa bengala (figura 6b), foi registrado alterações morfológicas de 27,4% além de grande sujidade e aglutinação. Kavamoto *et al.* (1999) registraram a existência de anormalidades morfológicas em 9,54% da amostra e a alta sujidade e a coloração desregulada gerada pela aglutinação (dificulta o reconhecimento das estruturas do espermatozoide) para o *Prochilodus scrofa*, também encontrado por Streid Jr. *et al.* (2004) em sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Figura 6. Espermatozoides de *Prochilodus nigricans*, (a) corado com *kit* panótico fixado com citrato de sódio; (b) corado com rosa bengala, fixados com formol salino



Fonte : do autor

A aglutinação dos espermatozoides, utilizando-se rosa bengala, pode ser causada pelas propriedades físico-químicas da água e do vidro das lâminas utilizadas (ARANA, 1997). A solução fixadora de formol-salino é bastante utilizado para fixar o sêmen de diversas espécies apresentando bons resultados, a saber: tilápia, *Oreochromis niloticus* (TEIXEIRA, 2013) e pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (MELO, 2010). A aglutinação do sêmen sem conservantes gera perda de material, pois os espermatozoides perderão a

motilidade e encontrarão maior dificuldade para fecundar o óvulo. Tal fato justifica portanto, a necessidade de estudos para se determinar um anti-coagulante que evite formação de aglutinações.

5.2. Caracterização espermática

Os espécimes de *Prochilodus nigricans* analisados apresentaram peso médio de 536,92 ±56g e comprimento de 29,33 ± 1,15cm. O *P.nigricans* encontrado na Bolívia foi estudado por Loubens e Aquim (1984) que estimaram o tamanho mínimo de primeira maturação sexual entre 25 e 30 cm. Santos *et al.* (1984) obtiveram tamanho mínimo de primeira maturação gônadal de 20 cm de comprimento total em espécimes encontrados na barragem de Tucuruí. Já Mota e Rufino (1997), no rio Amazonas, capturaram exemplares de 49 cm de comprimento total e tamanho mínimo e médio de primeira maturação de 28 cm e 35,5 cm, respectivamente. Considerando essas informações os exemplares analisados foram selecionados dentro da faixa descrita para animais maduros e pela liberação de gotas de sêmen mediante massagem abdominal. Esse gênero apresenta capacidade reprodutivas com 6 meses de idade, e assim possibilidade de conservação gamética de reprodutores jovens, com uma produção seminal de boa qualidade.

No presente trabalho, o sêmen do curimatá apresentou uma coloração leitosa e textura extremamente viscosa. De modo geral, associa-se a cor branco-leitosa à maior concentração de espermatozoides. Os valores encontrados para volume, osmolaridade, pH, taxa de motilidade, tempo de motilidade e concentração espermática encontram-se descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Estatística descritiva das características seminais (n = 20) de curimatá, *Prochilodus nigricans*, capturadas na Baixada Maranhense.

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Volume (µL)	450,0	1000,0	857,1	412,7	48
Concentração (x 10 ⁹ spzmL ⁻¹)	7,5	27,5	12,8	5,3	41
Ph	7,2	8,0	7,5	0,25	3
Osmolaridade (mOsm/kg)	218,0	243,0	230,8	12,6	5
Tempo de motilidade (s)	30,0	60,0	52,8	8,3	16
Motilidade (%)	90	100	95,0	2,7	3

O volume médio encontrado neste trabalho para o sêmen de *P. nigricans* foi de 857.1µL com grande variação (48%) entre os espécimes. Segundo Murgas *et al.* (2007), a curimba (*Prochilodus lineatus*) produz um volume de sêmen de 0,8 a 3,8mL. De acordo com Godinho (2000), o volume de sêmen de peixes varia entre espécies e espécimes de acordo com idade, método e época de coleta. Esta informação foi confirmada por Alavi *et al.* (2007), que também verificaram grande variação de volume entre espécimes de *Perca fluviatilis*. O volume encontrado para a espécie estudada foi abaixo de 1mL, valor que pode ser alterado com a aplicação de doses de estimulantes reprodutivos, como o GnRH e hipófise de carpa. A adição de um diluente adequado promoverá um aumento relativo do seu volume o que gera melhor estabilidade e capacidade natatória ao espermatozoide, visto que este sêmen é bastante denso e viscoso.

Determinar a proporção ideal de machos para cada fêmea na reprodução artificial permite uma melhor taxa de fecundação sem grande desperdício de gametas sendo assim necessário saber qual a produção média de gametas em fêmeas e machos. De acordo com Nynca e Ciereszko (2009), o entendimento da concentração de espermatozoides de uma espécie auxilia no controle da reprodução de peixes fazendo a relação de espermatozoide/ovócito corretamente. Nessa pesquisa, o valor médio da concentração espermática encontrada foi de $12,4 \pm 5,3 \times 10^9$ espermatozoides mL⁻¹ de sêmen. Essa média pode ser baixa quando comparada aos valores obtidos para curimbá, *Prochilodus lineatus* ($27,36 \pm 5,32 \times 10^9$ spz/mL) por Murgas *et al.* (2007), porém é superior ao valor registrado para piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (MURGAS *et al.*, 2004), e tilápia, *Oreochromis niloticus* (TEIXEIRA, 2013). Outros trabalhos mostram valores superiores para outras espécies como pacu, *Piaractus mesopotamicos* (MARIA *et al.*, 2004) e tambaqui, *Colossoma macropomum* (MENEZES *et al.*, 2008).

No geral esse valor de concentração é acima da média da maioria das espécies de água doce, o que demonstra um alto potencial de fecundação; todavia sua alta viscosidade pode diminuir a velocidade de natação dos espermatozoides comprometendo a fertilização quando *in vitro*. Outra questão é a relação de compensação existente na fisiologia reprodutiva da espécie, já que o baixo volume produzido foi compensado com uma grande quantidade de espermatozoides por microlitro.

Quanto ao pH, o valor médio encontrado foi de $7,5 \pm 0,25$, estando portanto, dentro da média registrada por Tabares *et al.* (2005) que afirmaram que em peixes de

águas continentais o pH é variável, de 6,5 a 8,5. No plasma seminal de salmonídeos foi encontrado valores acima dessa média geral; 7,5 a 8,5; os mesmo autores afirmam que o pH é fator determinante na ativação do sêmen de diversas espécies de peixe. Lahnsteiner *etal.* (1998) relataram que o pH do plasma seminal interfere na motilidade e na velocidade de natação dos espermatozoides.

Portanto a análise do pH é essencial no momento da preparação de uma solução diluidora para refrigeração e congelação, pois influencia no potencial de motilidade em espermatozoides de diversos grupos.

Neste trabalho a osmolaridade média encontrada foi de 243 mOsm/kg, próximo ao valor registrado pela literatura para peixes de água doce. Morisawa *et al.* (1983) observaram, em espécies de água doce, osmolaridades médias entre 266 a 317 mOsmol/kg. Para a carpa (*Cyprinus carpio*), os mesmos autores encontraram valor médio de 302 mOsmol/kg. De acordo com Vieira *et al.* (2011), a variabilidade da osmolaridade pode estar relacionada à característica individual e espécie-específicas, uma vez que esta variação também foi registrada para um tipo de caracádeo (VIEIRA *et al.*, 2011), salmonídeos e ciprinídeos (ALAVI; COSSON, 2006).

A osmolaridade também é um fator de influência direto sobre a motilidade espermática, sendo a ativação dos espermatozoides parcial ou totalmente dependente da tonicidade da solução diluente em relação ao plasma seminal (SHIMODA, 1999). A diferença da osmolaridade do plasma seminal em relação ao ambiente pode inibir ou ativar a motilidade espermática. Portanto, o conhecimento da osmolaridade do sêmen de peixes é importante para a elaboração de soluções ativadoras e diluentes para conservação dos gametas e pode interferir na taxa de espermatozoides móveis. Portanto, o conhecimento do pH e da osmolaridade fornecerá maior confiabilidade no ajuste desses parâmetros para diluidores de futuros protocolos do sêmen.

A porcentagem de espermatozoides móveis é um dos mais importantes parâmetros a ser observado na análise do sêmen de peixes (GODINHO, 2000) e pode ser influenciada por diversos fatores, como: temperatura, estado fisiológico, condição nutricional e de saúde, idade, condições de análises, soluções ativadoras e espécie estudada. Neste trabalho a porcentagem média de espermatozoides móveis do sêmen fresco da curimatá, logo após a ativação com água destilada, foi de $95 \pm 2,7 \%$. Valor superior ao encontrado por Kavamoto *et al.* (1996) para *Prochilodus lineatus*, que foi de $93,84 \pm 1,86 \%$, e inferior a $98,6 \pm 0,8\%$ registrado por Martinez, *et al.* (2012), para espécies do mesmo gênero.

Outra variável analisada foi o tempo de motilidade do espermatozoide, que apresentou média de $50,4 \pm 8,3$ s. A duração da motilidade espermática em peixes de água doce é variada entre as espécies (LEGENDRE *et al.*, 1996; COSSON *et al.*, 1999): 30-40 segundos em carpa, *Cyprinus carpio* (BILLARD *et al.*, 1995); 486 segundos para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (MARIA *et al.*, 2004); 300 s em dourado, *Salminus maxillosus* (CÓSER *et al.*, 1984); 30 s em truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (PERCHEC *et al.*, 1993) e 501 a 1.112s para tilápia, *Oreochromis niloticus* (TEIXEIRA, 2013).

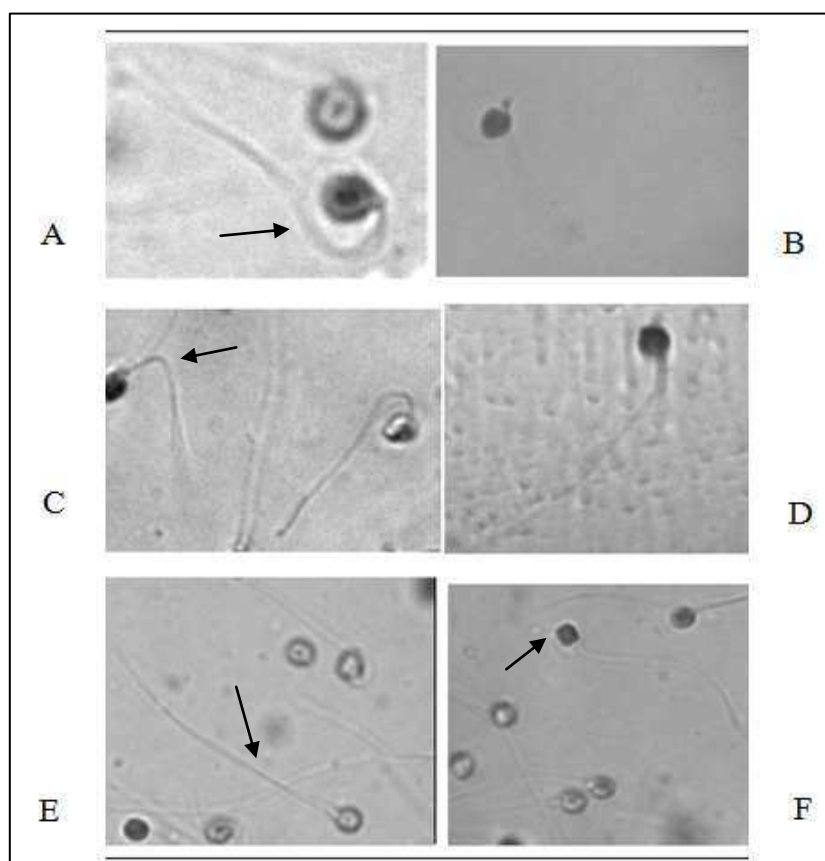
O tempo de motilidade é um fator de grande importância para espécies de peixes reofílicas como a curimatá, pois sua reprodução está geralmente sincronizada com fatores ambientais adequados às necessidades metabólicas, de maneira a incrementar a viabilidade dos gametas e favorecer o desenvolvimento da prole. O baixo tempo de motilidade dos espermatozoides de *P. nigricans* registrado nesse trabalho, comum às espécies de água doce, exige para sua utilização, alta taxa de motilidade, volume, concentração e boa conformação morfológica, para que possa garantir o sucesso no momento da fecundação, porém esses valores podem variar época do ano, condições de alimentação e estocagem, idade, indução hormonal além de outros fatores estressantes.

A avaliação morfológica do espermatozoide é parte importante dos estudos realizados sobre condições espermáticas, por se tratar de um indicador da capacidade de fertilização do animal de danos causados por agentes químicos ou físicos (VERSTEGEN *et al.*, 2002; GARCIA-HERREROS *et al.*, 2006). Defeitos da peça intermediária e da cauda afetam a motilidade espermática causando alterações no alinhamento, condensação e organização final dos feixes mitocondriais (MIRANDA *et al.*, 2004). As anormalidades morfológicas da peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de fertilização. Entre os defeitos observados, os mais comuns foram cauda dobrada e/ou enrolada e ausência de cauda (KAVAMOTTO, 1999)

Os defeitos morfológicos mais comuns nos espermatozoides da espécie pode-se observar na figura 7 .Neste, as deformações registradas foram de 10,1% do total de espermatozoides observados, essas alterações têm uma influência negativa no processo de fertilização (LAHNSTEINER *et al.*, 1996; LAHNSTEINER *et al.*, 1998; COSSON *et al.*, 1999). Para outros grupos de animais, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

(CBRA, 1998) já define um padrão de anomalias no espermatozoide, todavia não há descrição para peixes (PINHEIRO, 2013). Gracia (2011) afirma que essas alterações morfológicas podem ser causadas por diversos fatores, tais como: nutrição dos reprodutores, método de coloração e idade do reprodutor.

Figura 7. A e C: Peças intermediárias em posição retro-axial.; B: Espermatozoides sem cauda; D: peças intermediárias mal formadas E: ausência de defeitos F: Defeitos na cabeça (irregularidade da membrana)



Dentre as deformidades observadas o maior índice foi de 3,2% para defeitos da peça intermediária em forma de saca rolha e o menor foi para o defeito na cabeça, que somou 0,5% (Tabela 4). De acordo com Blom (1959), o defeito tipo saca-rolha consiste numa distribuição irregular das mitocôndrias ao longo da peça intermediária, dando um aspecto de saca rolhas. Kavamoto *et al.* (1998), estudando espermatozoide de *Prochilodus scrofa*, registraram 9,54 % de anormalidades e dentre os defeitos observados o maior índice foi defeitos na cauda (cauda dobrada, enrolada e ausência de cauda). Pinheiro (2013) encontrou no sêmen *in natura* de *P. brevis* 3,12 \pm 5,60% espermatozoides defeituosos, sendo o defeito na cauda foi o mais frequente.

Tabela 4. Percentual de características da morfologia do espermatozoide de curimatá, *Prochilodus nigricans* capturados na Baixada Maranhense

Defeitos morfológicos	Porcentagem (%)
Ausência	89,9
Defeitos na cabeça (irregularidade da membrana) e peças intermediárias mal formadas	2,8
Peças intermediárias em forma de saca rolha	3,2
Defeitos na cabeça	0,5
Espermatozoides sem cauda	2,1
Peças intermediárias em posição retro-axial.	1,5

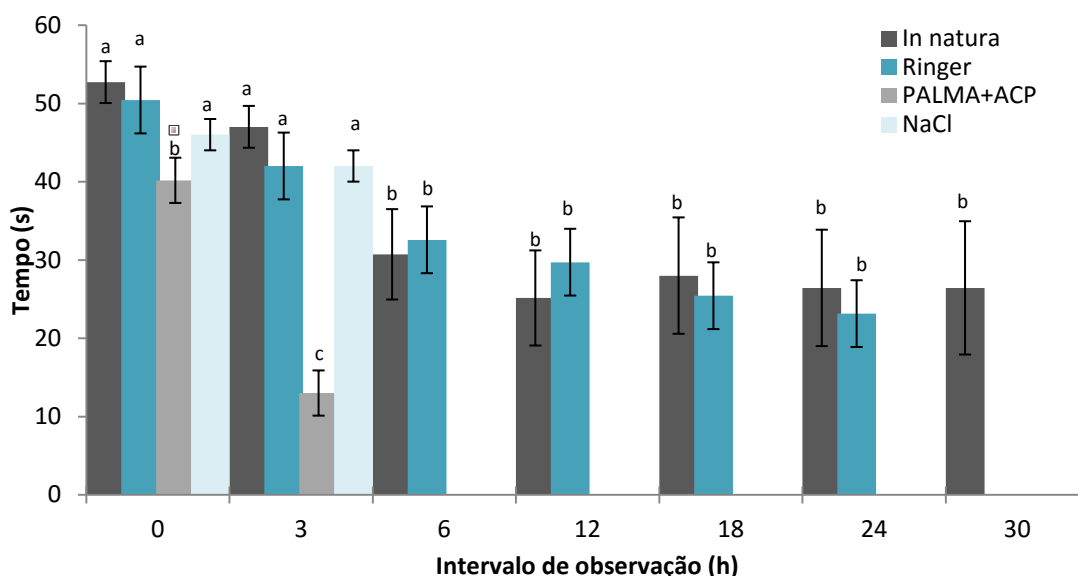
Segundo Gravance *et al.* (2000), a energia necessária para motilidade espermática é gerada nas mitocôndrias que fica localizada na peça intermediária, e produz energia em forma de adenosina trifosfato. A ATP é quebrada em moléculas pela trifosfatase, liberando a energia necessária para a movimentação da cauda (BARTH e OKO, 1989). Ou seja, alterações na produção energética da célula, associados com alterações morfológicas causa distúrbios na sua natação o que diminuirá a taxa de fecundação, reduzindo sua capacidade de chegada ao óvulo.

5.3. Refrigeração

Para aumentar o tempo útil do espermatozoide, durante o processo de refrigeração, são utilizadas as soluções inibidoras da motilidade espermática, com composições físicas e químicas semelhantes a do plasma seminal (PEÑRANDA *et al.* , 2010). Porém o sucesso do diluente não é garantido exigindo estudos antecessores à sua utilização.

No presente trabalho, não houve diferença para o tempo de motilidade espermática do sêmen *in natura* quando comparado ao sêmen diluído com ringer ($p > 0,05$), porém essa diferença foi registrada quando comparado a Palma +ACP ($p < 0,05$) no momento da adição ao diluente, conforme mostra a figura 8. Embora o sêmen diluído em Palma +ACP tenha apresentado tempo de motilidade inferior ao *in natura*, o mesmo é inviável nas três primeiras horas de refrigeração, pois a variação entre espécimes é de 30 e 60 segundos para o sêmen fresco. No intervalo de observação após 24h de refrigeração, a média do tempo de motilidade do sêmen *in natura* não deferiu de forma significativa da média do sêmen adicionado ao ringer, porém o tempo de motilidade foi reduzido nos dois tratamentos.

Figura 8. Tempo de motilidade de sêmen do curimatá, *Prochilodus nigricans*, diluído e refrigerado em diferentes intervalos de tempo.



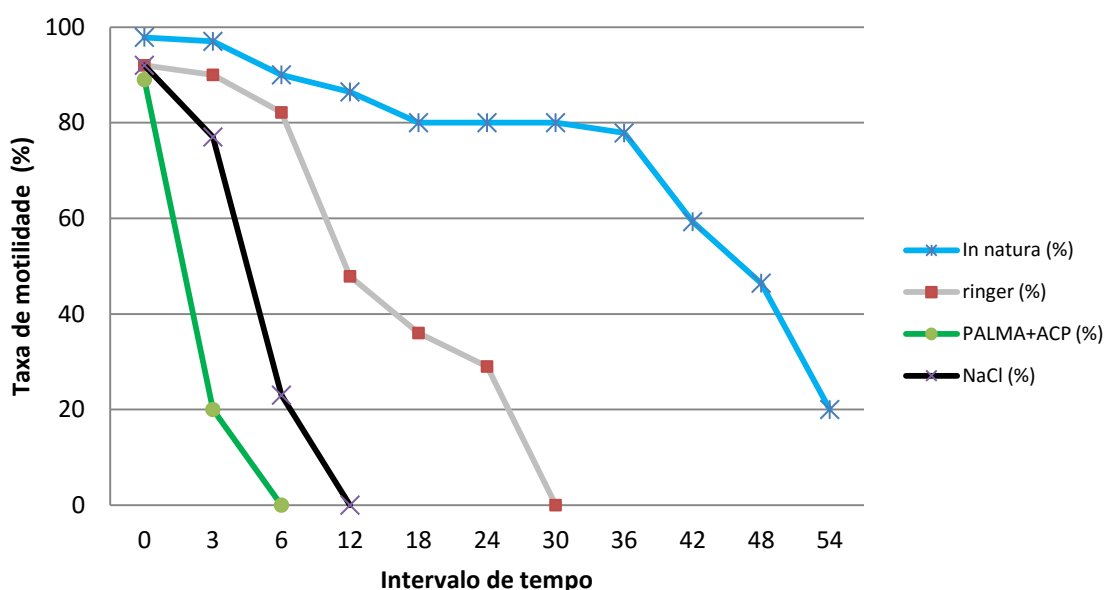
Embora a glicose seja um diluidor muito eficiente na conservação de sêmen de várias espécies de peixes (CAROLSFELD *et al.*, 2003; MURGAS *et al.*, 2004; SILVEIRA, 2000) por fornecer energia e agir como regulador e crioprotetor em função do seu alto peso molecular (HOLT, 2000), no presente trabalho, esta não se adequou ao sêmen de curimatá, pois promoveu aglutinação, inviabilizando os espermatozoides. Um dos fatores que provavelmente provocou essa aglutinação foi a alta viscosidade do sêmen. Cosson *et al.* (1999) afirmam que o sêmen viscoso apresenta difícil homogeneização ao diluente provocando a formação de suspensões de espermatozoides, já que suas células têm a tendência de permanecer em pequenos grupos formando uma suspensão heterogênea.

Para a sacarose, os resultados foram semelhantes aos obtidos nos testes com glicose embora alguns autores tenham obtido sucesso utilizando-a para o sêmen de algumas espécies como: *Esox masquinongy* (CIERESZKO *et al.*, 1999), *Cyprinus carpio* (HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI, 2003) e de *Paralichthys orbignyanus* (LANES, 2008).

O sêmen de *P. nigricans* adicionado de palma + ACP, imediatamente após a diluição, apresentou porcentagem de espermatozoides móveis semelhante aos demais diluidores, porém foi perdendo motilidade ao longo do tempo, atingindo menos de 20%

após três horas sob refrigeração. Resultados semelhante foram observados para o sêmen diluído em NaCl (Figura 9) que após ativação apresentou tempo de latência não sincronizado. Quando os resultados foram avaliados para solução de ringer, a motilidade espermática foi superior a 80% por até 6h após a refrigeração, sugerindo ser este o diluente adequado para a conservação em curto prazo. Quanto ao sêmen *in natura*, este apresentou boa qualidade por maior intervalo de tempo (42h) com aproximadamente 80% de motilidade.

Figura 9. Motilidade de sêmen do curimatá, *Prochilodus nigricans*, diluído e refrigerado em diferentes intervalos de tempo.



O uso de soluções de água de coco como diluente de sêmen de peixes é bastante utilizado e adequado a diversas espécies (VIEIRA, 2010). A água de coco foi utilizada como diluente de sêmen de carpa (*Cyprinus carpio*) objetivando o prolongamento da motilidade espermática, com ótimos resultados (CARVALHO *et al.*, 2002). Outros autores testaram a água de coco em quatro diferentes osmolaridades (100, 125, 150 e 300 mOsm/Kg) para o tambaqui, *Colossoma macropomum* (FARIAS *et al.*, 1999) e obtiveram melhor motilidade e sobrevivência espermática quando comparado ao sêmen *in natura*.

Para a espécie pesquisada nesse trabalho, os resultados quanto à refrigeração, não foram satisfatórios. Porém, para o mesmo gênero (*Prochilodus brevis*), Cajado (2014) obteve resultados diferentes e promissores quando testou extrato liofilizado de

palma forrageira (*Opuntia ficus indica*) em diferentes concentrações adicionadas a água de coco em pó observando-se 62% de motilidade pós-descongelamento.

Soluções de NaCl também são frequentemente usadas como diluidor para sêmen de peixes. Silva *et al.* (2014) afirmaram que o NaCl provocou grande período de latência aos espermatozoides de *P. brevis*. Os mesmos autores verificaram que os gametas não resistiram a primeira hora de refrigeração, semelhante aos resultados encontrados neste experimento. As soluções salinas de NaCl testadas por Oliveira (2014) para o sêmen de *Salminus maxillosus* também não foram eficientes na preservação.

Marques (2001) afirmou que as amostras de sêmen mantidas resfriadas devem apresentar motilidade de pelo menos 30% para que sejam utilizadas com sucesso na fertilização. A refrigeração do sêmen de *P. brevis* diluído em ringer por até 4 h de refrigeração permitiu a motilidade de 50% segundo estudo de Silva *et al.* (2014), resultado inferior ao encontrado para o *P. nigricans* no presente trabalho. Já em estudos de Moraes (2004) com *Leporinus macrocephalus*, foi registrado 44% de motilidade após 48 horas de armazenamento, enquanto que Maria (2005) obteve 63% de motilidade para o sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) por até 10 horas de refrigeração.

Nesta pesquisa foi verificado que passadas 12 h, o melhor resultado obtido foi com o sêmen *in natura*. Sanches *et al.* (2011) observaram que na preservação de sêmen de cioba, *Lutjanus analis*, quando refrigerado por até 24 horas, a taxa de motilidade do sêmen *in natura* apresentou melhor resultado quando comparado ao diluído. Já para o sêmen da pirapitinga, *Piaractus brachyomus*, Velasquez, (2008) observou melhor resultado quando diluído.

5.4. Toxicidade

A média de tempo de motilidade das amostras de sêmen *in natura* inicialmente (T4) foi de $43,4 \pm 3,7$ s. Os resultados obtidos para os testes de toxicidade das soluções diluidoras a base de DMSO para o sêmen de curimatá estão apresentados na tabela 5. Avaliação da duração da motilidade nos diferentes intervalos de tempos para cada tratamento não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 5- Motilidade (média \pm desvio padrão) do sêmen de curimatá, *Prochilodus nigricans* diluído em diferentes soluções com crioprotetor DMSO durante 30 minutos.

OBSERVAÇÃO	TEMPO DE MOTILIDADE(s)			MOTILIDADE (%)		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
0min	64,4 \pm 10,1 ^{Aa}	69,6 \pm 14,7 ^{Aa}	81,6 \pm 13,7 ^{Aa}	90 \pm 8,7 ^{aA}	97 \pm 4,5 ^{aA}	96 \pm 4,1 ^{aA}
10min	76,6 \pm 14,1 ^{Aa}	69,4 \pm 7,5 ^{Aa}	70,2 \pm 12,4 ^{Aa}	57 \pm 11,6 ^{bB}	82 \pm 11 ^{aA}	85 \pm 9,6 ^{aA}
20min	71,5 \pm 19,1 ^{Aa}	64,2 \pm 11,9 ^{Aa}	62,8 \pm 5,2 ^{Aa}	43,3 \pm 5,8 ^{aB}	71 \pm 14,4 ^{bB}	78 \pm 9,6 ^{bA}
30min	61,7 \pm 20,1 ^{Aa}	61,2 \pm 11,6 ^{Aa}	74,8 \pm 15,6 ^{Ab}	25 \pm 13,3 ^{aC}	63,7 \pm 19,9 ^{bC}	76 \pm 9,6 ^{bA}

Letras minúsculas distintas representam diferença significativa entre colunas (diluidores) e letras maiúsculas distintas representam diferença significativa entre linhas (diluente) ($p < 0,05$). (T1) =DMSO + NaCl + sêmen, (T2) = DMSO + Ringer + sêmen, (T3) DMSO + Solução de Palma com ACP + sêmen .

O tempo de motilidade dos espermatozoides foi semelhante nos tempos 0, 10 e 20 minutos após a diluição, para todos os tratamentos com diferença significativa somente com 30 minutos depois de diluído e refrigerado, quando a combinação água de coco + extrato de palma forrageira obteve melhor tempo de motilidade (74,8 + 15,6s). Vale salientar que esse tempo foi superior a média de duração (29s) registrada para o sêmen *in natura*. Huang *et al.* (2004), estudando sêmen de *Xiphophorus helleri* diluído em água de coco, observaram baixa motilidade espermática, enquanto que para o sêmen de *Carassius auratus*, Souza (2010), utilizando o mesmo diluidor, obteve um tempo de 181,5 s e taxa de 100%, resultados considerados excelentes para as espécies.

Em relação à porcentagem de espermatozoides móveis não houve diferença entre os tratamentos realizados neste trabalho no tempo inicial (0min). Porém passados 10 minutos de refrigeração o tratamento com DMSO e NaCl (57 \pm 11,6%) apresentou valores inferiores aos demais, sendo estes valores 82 \pm 11,0% e 85 \pm 9,6%, respectivamente ringer e a palma adicionados com DMSO. Essa tendência foi verificada nos tempos 20 e 30 minutos após a refrigeração. Esses resultados foram inferiores ao verificado por Godinho *et al.* (2003) para sêmen de *Oreochromis niloticus*, que foi de 92% na primeira ativação, utilizado o DMSO e superiores ao encontrado por Cruz (2001) para o sêmen de *P. lineatus* quando obteve a motilidade de 62% com o mesmo crioprotetor. Medina (2008) em estudos com o sêmen de *Piaractus brachipomus* utilizou a solução de ringer com DMSO 10% e verificou maior velocidade do espermatozoide quando comparou a outros tratamentos. Essa característica também foi observada neste trabalho para os tratamentos T2 e T3.

Sanches (2009) utilizou o DMSO em concentrações de 5% e observou efeito deletério para os espermatozoides de *E. marginatus*. Nossos resultados sugerem que o

DMSO a 10% apresentou baixa toxicidade para o sêmen de *P. nigricans* principalmente quando combinado a palma+ água de coco. Kasai (1996) afirma que a baixa toxicidade é representada também pela rápida penetração do crioprotetor na célula, prevenindo lesões.

6. Conclusão

O kit Panótico de Hemograma Instant- Prov combinado ao fixador formol citrato pode ser utilizado com eficiência para corar sêmen de *P. nigricans*.

A viscosidade do sêmen da espécie analisada, embora esteja relacionada a alta concentração, reduz o aproveitamento em virtude da perda causada pela impregnação nos frascos de armazenamento.

O sêmen apresentou alta concentração espermática, porém com alta variação entre espécimes.

O espermatozoide do *P. nigricans* apresentou baixo tempo de motilidade, semelhante a maioria das espécies de água doce, o que provavelmente é compensado pela alta concentração no momento da fecundação.

Quaisquer substâncias adicionadas ao sêmen podem gerar anomalias na estrutura morfológica do espermatozoide, o que trará comprometimento na qualidade do material e alterando resultados.

Os resultados da motilidade espermática do sêmen mantido sob refrigeração sugerem que a solução de ringer é o diluidor adequado para utilização em protocolos de refrigeração do sêmen de *Prochilodus nigricans*.

Para utilização do sêmen da espécie em até 24 h não é necessário a utilização de soluções diluidores, pois este ainda consegue manter qualidade para reprodução.

O extrato liofilizado de palma forrageira + água de coco, combinado ao DMSO 10%, oferece menor toxicidade ao sêmen de *P.nigricans*, com margem de segurança de até 30 minutos para criopreservação.

Referências

AGOSTINHO AA. MATSUURA Y. OKADA EK. NAKATANI K. The catfish, *Rhinelepis aspera* (Teleostei; Loricariidae), in the Guaíra region of the Paraná River: an example of population estimation from cath-effort and tagging data when emigration and immigration are high. **Fish Res**, v.23, p.333-344, 1995.

ALAVI, S. M. H., COSSON, J., KARAMI, M., AMIRI, B. M. AND AKHOUNDZADEH, M. A., 2004. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effects of pH, dilution ratio, ions and osmolality. **Reproduction**, 128, 819- 828.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: II. effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v.29, p.101-110, 2005.

ALAVI, S.M.H.; RODINA, M.; POLICAR, T. et al. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, v.68, p.276-283, 2007.

ANDRADE, D.R; YASUI, G.S. 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.

ANDRADE-TALMELLI, E.F., KAVAMOTO, E.T. E FENERICHVERANI, N. 2001. Características seminais da piabinha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim Instituto de Pesca**. São Paulo 27: 149-154

ARANA, L.V. Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura. Florianópolis: **DAUFSC**, 1997. 166p

BALLOU, J. D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Criobiology**. New York, v.29, p. 19-25, 1992.

BARTH, A.D., OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. **Ames: Iowa State University Press**, 285p., 1989.

BILLARD, R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm: a review. **Aquaculture**, v. 236, p. 1-9, 2004.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v.129, n.1-4, p.95-112, 1995.

BLOM E. A rare sperm abnormality: corkscrew-sperm associated with sterility in bulls. **Nature** 1959;183:1280–1

BOBE, J; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.

BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viscosa, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BOWEN, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. **Biology of Fish**, v.9 , n.2, p.137-144, 1983.

BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php?option=com_contentview=articleid=300:boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011ecatid=7eItemid=303>. Acesso em: 26 abr. 2015.

BUCKUP, P. A., N. A. MENEZES e M. S. GHAZZI, 2007. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Série livros 23, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 195 p.

CAJADO, F. J.L. **Utilização de extrato liofilizado de palma forrageira gigante, *Opuntia ficus indica* e água de côco em pó (acp-104), para a criopreservação do sêmen de curimatã (*Prochilodus brevis*)**. Tese de doutorado. Programa De Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará.Fortaleza , Ceará. 2014

CAMPOS, V.T.P. **Inducción a la ovulación y espermiogéneis em el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nicholsy Murphy, 1922) y almacenamiento de su sêmen**. Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Maestro en Ciencias en Menejo de Recursos Marinos, Instituto Politécnico Nacional, 96 p., La Paz, 2006

CARNEIRO P. C. F., Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. Embrapa Tabuleiros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte. 2007.

CARNEIRO, P. C. F. *et al.* Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006

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

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Curso de Treinamento Brasileiro. **Victoria: World Fisheries Trust**, 1999. 41p.

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.

CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. cap 9, p. 71-96.

CASTRO, R. M. C. 1991. Sistemática e distribuição geográfica da família Prochilodontidae (Ostariophysi, Characiformes). In: **Encontro Brasileiro de Ictiologia, IX**. Maringá, Pr, 1991. Resumos. Maringá. SBI/NUPELIA, p.128.

CASTRO, R.C.M; VARI, P.P .2004.. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiforme): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Books**, Washington, DC, (622), 189p.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**, 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p 1998.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa* **Ecotoxicology and Environmental Safety**., San Diego, v. 52, n. 2, p. 83-91, June 2002.

CHEN, S. L. e TIAN, Y. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v. 63, p. 1207-1219, 2005.

CIERESZKO, A. et al. The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 313-315, 1999.

COSER, A.M., GODINHO, H., RIBEIRO, D.M. (1984) Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* e *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, 17:387-390.

COSSON, J., LINHART, O., MIMS, S., SHELTON, W., RODINA, M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. **Journal. Fish Biol.** v. 56, p. 1348 – 1367, 2000

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

CRUZ, V.L.B. **Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2001. 59p. Dissertação

(Mestrado em Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2001.

CRUZ-CASALLAS, P.E., LOMBO-RODRÍGUEZ, D.A. AND VELASCO-SANTAMARÍA, Y.M. 2005. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. **Aquaculture. Res.**, 36: 682-686.

DEGREEF J, ROCHA OJ, VANDERBORGHT T, BAUDOIN JP. (2002) Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of lima bean (Fabaceae): Considerations for in situ and ex situ conservation. **American Journal of Botany** 89 (10): 1644–1650.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2009. **El estado mundial de La pesca y La acuicultura** . Disponível em <http://www.fao.org/docrep/010/a1495e/a1495e00.htm>. Acessada em 17/05/2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) **World fisheries production by capture and aquaculture, by country** . Disponível em: <http://www.fao.org/fi/website/FIretrieveAction.do?dom=topicefid=3459>. Acesso em: 15/09/2013

FARIAS, J. O. *et al.* Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

FOGLI DA SILVEIRA W., KAVAMOTO E. T., RIGOLINO M. G., TABATA Y. A. O. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim Instituto de Pesca**, v.15, p.51-54, 1988.

FONSECA, V. O. *et al.* Procedimento para Exame Andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 1992.

GARCIA-HERREROS M., APARICIO IM, BARON F. J., GARCIA MARTIN L. J. , GIL, M. C. . Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **Int J Androl**, v.29, p.553-563, 2006.

GAYLOR CHEMICAL COMPANY. 2007. **Dimethyl sulfoxide (DMSO) health and safety information**. Slidell. Bulletin 106. 16p

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, 2000.

GODINHO, H. P.; AMORIM, M. C.; PEIXOTO, T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. chitralada: crioprotetores, soluções

ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.

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, n.3, p.351- 360, 2007.

GRACIA, L. F. G. **Alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes**. monografia. Curso de medicina Veterinária. Universidade federal do Rio Grande 2011.

GRAVANCE, C.V.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000.

GURGEL, L.L., VERANI, J. R.; CHELLAPPA, S. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. **The Scientific World Journal (Ecology Domain)**. Article ID 810532, p. 1-7, 2012.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole Ltda. 2004

HAGEDON, M VAN OPPEN, M. J., CARTER, V., HENLEY, M., ABREGO, D., PULL-STEPHAN, E. First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. **Cryobiology**. New York, v.65 n.2, p. 157-158.2012

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HORVÁTH, Ákos; MISKOLCZI, Edit; URBÁNYI, Béla. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 05, p. 457-460, 2003.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, p. 729-734, 2005.

HUANG, C. ; DONG, Q., WALTER, R. B., & TIERSCH, T. R.. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphoporus helleri*, a fish with internal fertilization. **Cryobiology**, v. 48, p. 295-308, 2004.

IBAÑEZ, M. S. R.; CAVALCANTE, P. R. S.; COSTA-NETO, J. P.; BARBIERI, R.; PONTES, J. P.; SANTANA, S. C. C.; SERRA, C. L. M.; NAKAMOTO, N.; MITAMURA, O. Limnological characteristics of three aquatic systems of the pré-amazonian floodplain, Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). **Aquatic ecosystem health and management** (3). p. 521-531. 2000.

IBGE. **Resultados do Censo 2010**. Disponível em: www.censo2010.ibge.gov.br. Acesso em: 22/12/2013

IHERING, R. V., E AZEVEDO, P. D. .1981.A curimata dos acudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). 2a. **Coletanea de trabalhos tecnicos:[pesca e piscicultura.**

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KAVAMOTO, E. T; BARNABÉ, V. H.; CAMPOS, B. E. S; TALMELLI, E. F. A. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimbatá, *prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo. v. 25 n. (único), p. 61 - 66, 1998/1999.

KAVAMOTO, E.T. E FOGLI DA SILVEIRA, W. 1996. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre (*Rhamdia hilarii valenciennes*, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, 13: 95-100

LAHNSTEINER, F.; Berger, B.; Weismann, T. e Patzner, R.A. (1998). Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture** 163(1-2):163–181

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.

LANES, C. F. C. **Caracterização, criopreservação e manipulação genética do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae)**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2008.

LEBOEUF B, RESTALL B, AS\$LAMON S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**. 2000; 62: 113-141

LEGENDRE, M. e BILLARD, R., 1980 Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. **Reproduction, Nutrition, and Development**, London, 20: 1859-1868.

LENZ, D, R. **Caracterização e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás. 2014

LINHARES, F.R A. Efeito de diferentes taxas de diluição e protocolos de congelação sobre a cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum (*Cyprinus carpio*) criopreservados em água de coco em pó (ACP-104). 2012. 80f. **Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará**, 2012.

LIZAMA, M. A. P. Estimativa do parâmetros de crescimento, recrutamento e mortalidade de *Prochilodus lineatus* da planície de inundação do Alto Rio Paraná, **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.26, n. 2, 121-128, 2000.

LÓPEZ, C.M. **Crescimento de larvas de cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*) Spix e Agassiz, 1829 (Osteichthyies: Siluriformes, Loricariidae), submetidos a diferentes dietas alimentares.** 2005. 45f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, SP, 2005

LOUBENS, G. E AQUIM, J.L. Primeras observaciones sobre la sexualidad y la reproduccion de las principales espécies de peces de la region de Trinidad, Beni, Bolivia. Informe **Científico: Convênio ORSTOM-UTB-CORDEBENI.** (1), 1984. 34p.

MAGNAGO, L. G. P. **Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça pastor alemão resfriado a 5 oC .** 2000. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

MAIA, E. L.; OLIVEIRA, C. C. S.; SANTIAGO, A. P.; CUNHA, F. E. A.; HOLANDA, F. C. A. F.; SOUSA, J. A. Composição química e classes de lipídios em peixe de água doce Curimatã comum, *Prochilodus cearensis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 433-437, Sept./Dec. 1999.

MARANHÃO, Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico – GEPLAN, Laboratório de Geoprocessamento. **Atlas do Maranhão.** São Luís: UEMA. 2002. 44p.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).** 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARIA, A. N; MURGAS, L. D. S., SILVA, M. O. B., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T., & LOGATO, P. V. R Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 191-194, 2004.

MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001

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

MARTINEZ, J. G.; Sperm cryopreservation of freshwater fish bacachio (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO na glucose and its effects on fertilization and hatchig. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v9, n.1, p.19-26. jan/mar.2012

MEDINA, S. P. V. **Criopreservação do sêmen de pirapitinga *Piaractus brachypomus* (PISCES, CHARACIDAE)**. 2008 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

MELO, M.A.P. **Água de coco em pó (acp-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES Jr, J. B. Avaliação espermática pós-congelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v. 38, p. 365-368, 2008.

MIRANDA, Paula de Almeida Barbosa et al. Morfometria da Cabeça Espermática em Touros Nelore Submetidos a Deficiência de Zinco na Dieta. **Embrapa Gado de Corte**. Documentos, 2004

MOJICA, CAMILO ALBERTO PRIETO. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. São Paulo. 2004

MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*)**. 2004. 68f. 2003. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MORISAWA, M., SUSUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, v.210, p.1145-1147, 1983.

MORTON, D. B.; BRUCE, S. G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 39, p. 311-316, 1989

MOTA, S.Q; RUFFINO, M.L. Biologia e pesca do curimatá (*Prochilodus nigricans* AGASSIZ, 1829) (*Prochilodontidae*) no médio Amazonas. **Revista UNIMAR**. Vol 19, n.2, p.493-508, 1997.

MUNIZ, F. H. A vegetação da região de transição entre a Amazônia e o Nordeste: diversidade e estrutura. In: Emanuel Gomes de Moura. (Org.). **Agroambientes de transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido do Brasil: atributos, alterações e**

uso na produção familiar. 2 ed. São Luís: Programa de Pós-graduação em Agroecologia/UEMA, v. 1, p. 53-69. 2007.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

MURGAS, L. D. S., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T., E MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** 2008. 87f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008.

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

NYNCA, J *et al.* Changes in sperm parameters of sex-reversed female rainbow trout during spawning season in relation to sperm parameters of normal males. **Theorigenology**. v.77, p 1381-1389.2012.

NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Measurement of concentration and viability of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) spermatozoa using Computer-aided Fluorescent Microscopy. **Aquaculture**, v. 292, p. 256-258, 2009.

OLIVEIRA, A. V. *et al.* Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

OLIVEIRA, A.V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de Pirapitinga *Brycon nattereri*.** .Dissertação de mestrado Programa de pós graduação em zootecnia. Universidade Federal de Lavras, 2014.

PADHI B K AND MANDAL R K. 2000. Applied fish Genetics. **Fishing Chimes**, Visakhapatnam, Andhra Pradesh, India, 190p.

PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; GALLEGO, V.; MAZZEO, I.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.659-664, 2010.

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.

PESSOA, N. O. **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.** 2009. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009

PICKETT BW, AMMAN RP. Cryopreservation of semen. In: MICKINNON AO, VOSS JL (ed). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993: 769-789.

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

PINHEIRO, J. P. S. Morfologia do sêmen criopreservado de curimatã em máquina de congelação **Resumos Expandidos do I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO** (v.2) Universidade Católica de Pernambuco - Recife - PE - Brasil - 11 a 14 de novembro de 2013.

POMPELLI, M. F. e GUERRA, M. P. 2004. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 4(3): 273-279.

QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, p. 128-146, 1985.

RANA K. Preservation of gametes. In: Bromage NR, Roberts, RJ (Ed.). Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge: **Cambridge University Press**, p.88-94, 1995.

ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B. et al. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

ROTH, P. G. e SCOTT, D. A. A avifauna da Baixada Maranhense. IN: BRASIL. Secretaria Especial de Meio Ambiente/ Internacional Waterfowl Research Bureau-IWRB/ Companhia Vale do Rio Doce. **Desenvolvimento econômico – impacto ambiental em áreas de trópico úmido brasileiro: a experiência a CVDR**. Anais. Rio de Janeiro, 1986. P.117-128.

RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28, 2004

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1, p. 77-111, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.77-111, 2000.

- SALGUEIRO, C.C.M. E NUNES, J.F. 1999. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, 23
- SALGUEIRO, C.C.M. e NUNES, J.F. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, 1999.
- SALMITO-VANDERLEY CSB, Vieira MJAF, Leite LV, Oliveira FCE, Linhares FRA, Salgueiro CCM, Nunes JF. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v.22, n.1, p.255-268, 2012
- SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S. Criopreservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Settanidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 389-399, 2009.
- SANCHES,E. G; CERQUEIRA,V. i. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1673-1680, 2011
- SANTOS, M.G., JEGU, M. e MERONA, B. **Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins**. Projeto Tucuruí. Manaus: ELETRONORTE/CNPq/INPA, 1984.
- SANTOS-FILHO, L. C.; BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. **Zoologia**, v.26, n.2, p.195-203, 2009.
- SANTOS-FILHO, L. C.; BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. **Zoologia**, v.26, n.2, p.195-203, 2009.
- SEMATUR, 1991. **Diagnóstico dos principais problemas ambientais do Estado do Maranhão**. São Luís. p. 127.
- SEVERO, C. K. **Avaliação da adição de cisteína no sêmen resfriado para a inseminação em suínos. 2009.** 93f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul.
- SHANGGUAN, B., CRIM, L.W. The effect of stripping frequency on sperm quantity and quality in winter flounder (*Pleuronectes americanus* Walbaum) in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995.
- SHAW, J. M. In: A. Trounson, D. Gardner. **In Vitro Fertilization**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1993. Chap.11.
- SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877) (Pisces, Characidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. Rio de Janeiro. 124 p, 2004.

SHIMODA, E., ANDRADE, D.R., CRUZ, G.M., SILVA, J.F.S. E GODINHO, H.P. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotâmicus*; Holmberg, 1887) hipofisado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, 23: 151-478, 1999.

SILVA, A. C. et al. Caracterização e resfriamento do sêmen de curimatã, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1874). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 3, p. 105-129, 2014.

SILVA, J.M.; 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. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Brasil. v.10, n.3, 2009.

SOARES, E.C. **Peixes do Mearim**. 143p.: il. Edição bilíngüe: Português – Inglês. São Luis: Instituto Geia, 2005.

SOUZA, M. F. DA S.; JR, AMARAL, H. Análise da técnica de criopreservação de sêmen do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) para a formação de um banco de germoplasma-Cryopreservation. REDVET. **Revista electrónica de Veterinaria**, v. 11, n. 11, p. 1-19, 2010.

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

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservation of fish gametes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM REPRODUCTION PHYSIOLOGY FISH, 1982, Wageningen. **Proceedings Wageningen**, p. 114-122, 1982.

STREIT-JUNIOR, D. P. MORAES, G. V., RIBEIRO, R. P., POVH, J. A., SOUZA, E. D., & OLIVEIRA, C. A. L. . Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos ciências veterinárias e zoologia**. UNIPAR, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

SUQUET, M., DORANGE, G., OMNES, M.H., NORMANT, Y., LE ROUX, A., FAUVEL, C. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*) **Journal of Fish Biology** 42:509-516, 1993.

TABARES, J.; TARAZONA, A.; OLIVEIRA, M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 18, p. 149-16. 2005.

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

TEIXEIRA, E.G.; **Caracterização e criopreservação de sêmen de tilápia-do-nilo cultivada no estado do Ceará.** Tese de Doutorado. Fortaleza (Ce): Universidade Federal do Ceará, 2013. 40 p. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil.

TIBA, R. M. ; OLIVEIRA, I. D. R., SERRALHEIRO, P. C. S., & OSTINI, S. Diluentes e proporções sêmen-diluyente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 99-110, 2009.

UFAM- **Peixes Manaus 4**.Laboratório de zoologia .2011.Disponível em: http://www.zoologia.ufam.edu.br/Vertebrados%20I%202011/Peixes_comerciais_de_Mananaus4.pdf Acesso em 01 de julho de 2011.

VALE FILHO, V. R. do. Subfertilidade em touros: Parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte:** F.E.P.M.V.Z. n.35, p.81-87, ago. 2001a.

Vazzoler, A. E. A. M., Menezes, N.A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysii). **Revista Brasileira de Biologia.**, 1992, nº 52 p. 627-640.

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.

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

VIEIRA, M.J. A. F. 2010. **Caracterização do sêmen de tambaqui Colossoma macropomum (CUVIER, 1818) e Criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104).** Tese de Doutorado. Fortaleza (Ce): Universidade Estadual do Ceará, 2010. 114 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil

VIEIRA, M.J.A.F; CARVALHO, M.A.M; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B; SALGUEIRO, C.C. de M; VIVEIROS, A.T.M; MOURA, A.A.A.N; NUNES, J.F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archives Zootechn.** 60 (232): 1263-1270. 2011.

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

VIVEIROS, A. T. M., ORFÃO, L. H., MARIA, A. N., & ALLAMAN, I. B *et al.* A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 293-300, 2009a.

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

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

ZANIBONI FILHO,E. e WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, 2007.