

Água de coco como diluente para o sêmen de peixes de água doce de fertilização externa

Maria Audália Marques de Carvalho¹, Francisco Renan Aragão Linhares¹, José Ferreira Nunes^{1*}, Cristiane Clemente de Melo Salgueiro², Raimundo Bezerra da Costa³ Ronaldo de Oliveira Sales⁴

Resumo: A água de coco em pó (ACP) constitui-se na atualidade uma alternativa tecnológica para a conservação dos recursos aquáticos e inovadora para a produção aquícola do Nordeste do Brasil. Porém poucos existem sobre o comportamento cinético de espermatozoides de peixes de fertilização externa criopreservados em água de coco em pó (ACP-104). Deste modo, a presente revisão faz um levantamento dos estudos já publicados sobre a criopreservação do sêmen de peixes de fertilização externa em meio à base de água de coco em pó (ACP-104) iniciado em 2007 até 2013. A motilidade média observada entre os diferentes estudos variou desde $13 \pm 2,0\%$ a $85 \pm 12\%$ enquanto a maior velocidade (VCL) foi registrada por VIVEIROS et al. (2010) para o sêmen de *Prochilodus lineatus*, $53,7 \pm 25,1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ seguido por LINHARES et al. (2012) para o sêmen de carpa comum ($46,5 \pm 7,3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) demonstrando assim a viabilidade do diluente ACP-104 como meio de criopreservação para o sêmen de teleósteos de água doce de fertilização externa. Resultados negativos foram observados apenas para *Leporinus obtusidens* com zero de motilidade. Conclui-se assim que a água de coco em pó pode ser usada como diluidor do sêmen de peixes de água doce que realizam a fertilização externa

Palavras chave: ACP-104, Dryshipper; taxas de diluição; teleósteos.

Coconut water as extender for sperm of freshwater fish with external fertilization.

Abstract: Actually coconut water powder (ACP) constitutes an alternative technology for conservation of aquatic resources and innovative for aquaculture production in the Northeast of Brazil. There are few studies on the kinetic behavior of fish sperm with external fertilization cryopreserved in powdered coconut water (ACP-104). However, the studies suggest the feasibility of ACP-104 as a medium for the cryopreservation of fresh water teleost. Thus, this review is a survey of the published studies on fish sperm cryopreservation in an extender based on coconut water powder (ACP-104) started in 2007 until 2013. The average motility observed in this different studies ranged from $13 \pm 2.0\%$ to $85 \pm 12\%$ while the greater curvilinear velocity (VCL) was recorded by Viveiros et al. (2010) for sperm of *Prochilodus lineatus*, ($53.7 \pm 25.1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), and $46.5 \pm 7.3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ for common carp sperm registered by LINHARES et al., 2012. Negative results were observed only for *Leporinus obtusidens* with no motility after cryopreservation. It is concluded that coconut water powder ACP-104 can be used as an extender for sperm of freshwater fish that carry out external fertilization.

Key words: ACP-104, Dry shipper, dilution rate, teleosts.

¹Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Universidade Potiguar- Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

⁴DZ/CCA/UFC

Correspondência:

*Av. Dedé Brasil, 1700, Campus do Itaperi

Núcleo Integrado de Biotecnologia - 60714-242 Fortaleza, Ceará, Brasil

Autor para correspondência - * ferreiranunes@pq.cnpq.br

Submetido em 10.11.2014; Aceito em 28.12.2014

Introdução

Na tecnologia de conservação de gametas a elaboração e uso de diluentes é fundamental para o sucesso da criopreservação. Os diluentes têm por finalidade nutrir e proteger os espermatozoides contra os efeitos da

baixa temperatura de conservação (VIEIRA, 2010). Para o sêmen de peixes uma variedade de diluentes tem sido proposta, contudo, os resultados são diversificados devido a diferenças entre protocolos e espécies utilizadas, dificultando a comparação.

Na atualidade um novo diluente natural e orgânico à base de água de coco em pó (ACP) vem sendo proposto para a criopreservação de sêmen com resultados satisfatórios em algumas espécies de mamíferos (SILVA et al., 2011), aves (RONDON et al., 2008), e peixes (CARVALHO et al., 2002), contudo os estudos em peixes encontram-se em sua fase inicial (NASCIMENTO et al., 2007; VIVEIROS et al., 2008). O sucesso da água de coco deve-se à sua rica composição em sais minerais, aminoácidos, proteínas e fatores de crescimento vitaminas, antioxidantes e baixo teor em fosfolipídios (AROCHA et al., 2002), constituindo-se num meio nutritivo favorável à sobrevivência dos espermatozoides.

A avaliação de protocolos de congelamento é feita através da análise da qualidade seminal pós descongelamento utilizando parâmetros como motilidade espermática, velocidade, morfologia, integridade de membrana, taxa de fertilidade e morfologia de larvas obtidas com sêmen criopreservado.

A água de coco em pó (ACP) constitui-se numa alternativa tecnológica inovadora para a conservação dos recursos aquáticos (VIEIRA, 2010) e produção

aquícola do Nordeste do Brasil. São poucos os estudos existentes sobre o comportamento cinético de espermatozoides de peixes, de fertilização externa, utilizando a água de coco em pó (ACP-104) como meio de criopreservação. Em função dessa carência, a presente revisão faz um levantamento dos estudos publicados sobre a criopreservação do sêmen de peixes de fertilização externa, em meio à base de água de coco em pó (ACP-104), no período compreendido entre 2007 e 2013. Os resultados apresentaram uma motilidade média que variou de $13 \pm 2,0\%$ a $85 \pm 12\%$, com uma maior velocidade (VCL) de $53,7 \pm 25,1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, registrada por VIVEIROS *et al.* (2010) utilizando o sêmen de *Prochilodus lineatus*, seguido por LINHARES *et al.* (2012) para o sêmen de carpa comum ($46,5 \pm 7,3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$). Isto demonstra a viabilidade do diluente ACP-104 como meio de criopreservação para o sêmen de teleostes de água doce de fertilização externa. Foram encontrados resultados negativos apenas para *Leporinus obtusidens*, em que observou-se motilidade zero. Conclui-se assim que a água de coco em pó pode ser usada como diluidor do sêmen de peixes de

água doce que realizam a fertilização externa.

O diluidor água de coco

A água de coco *in natura* como base para diluidor de criopreservação de gametas foi testada pela primeira vez no Brasil com o sêmen de caprinos sendo observado um aumento do vigor e na qualidade espermática em comparação ao diluente leite, além de uma maior proporção de fêmeas nascidas quando o ACP foi usado como diluente para o sêmen de caprinos (NUNES, 1986; SALLES, 1989). UCHOA et al. (2012), criopreservando o sêmen de cães em ACP106c obteve também o nascimento de um maior número de fêmeas, confirmando os resultados anteriores de (UCHOA, 2004). Porém, as razões pelo qual este fato ocorre ainda não foram investigadas.

Os primeiros ensaios utilizando a água de coco *in natura* como diluente para o sêmen de peixes foram realizados por FARIAS et al. (1999) para a congelação do sêmen de tambaqui, *Collossoma macropomum*. Para o sêmen de carpa comum, (*Cyprinus carpio*) CARVALHO et al. (2002) verificaram que o diluente à base de água de coco *in natura* (ACIN) ampliava o tempo de motilidade dos espermatozoides frescos sugerindo seu uso como meio de

ativação para espermatozoides descongelados.

Contudo, a grande dificuldade era transformar o diluente ACIN num produto comercial padronizado e disponível a qualquer momento, e em qualquer lugar, de vez que, logo após a retirada do cacho e abertura do coco a água de coco iniciava o processo de contaminação bacteriana e degradação enzimática (ROSA; ABREU, 2000), o que dificultava a conservação do diluente.

Vários processos de conservação e estabilização da água de coco foram testados: O cocoin *natura* fechado e protegido por parafina, polifilme ou quitosana, não conseguia manter a qualidade original do fruto por mais de 40 dias (AROUCHA et al., 2006; RESENDE et al., 2007).

Embalagens como tetra pak conservam por até seis meses, contudo apresentam sabor diferenciado do fruto original (ROSA & ABREU, 2000). O problema parece estar resolvido após o surgimento da água de coco sob a forma em pó (ACP), obtida por processo de liofilização a alto vácuo o qual mantém os constituintes do fruto *in natura*, com o mesmo sabor e alta solubilidade e estabilidade em prateleira, superando o tempo de conservação de outros

métodos como biofilmes, parafina ou *hot fill*, (Tabela 1) podendo assim ser exportada para países não produtores do fruto ou regiões distante dos centros produtores da água de coco (PATENTES ON LINE, 2004).

Principais espécies utilizadas na criopreservação do sêmen de peixes de fertilização externa em meio à base de água de coco em pó (ACP-104).

A criopreservação do sêmen é uma ferramenta valiosa para proteção dos estoques naturais ameaçados ou em vias de extinção. Deste modo, a utilização da ACP pode representar um meio pelo qual estas espécies podem ser preservadas.

Todas as espécies testadas até o momento são migradoras e habitantes naturais das bacias brasileiras, com exceção da carpa comum, *Cyprinus carpio* que é uma espécie exótica de águas paradas e uma das mais cultivadas em todo o mundo, representando um modelo para estudo em várias áreas. Além disso, todas são importantes do ponto de vista comercial.

A piracanjuba, *Bryconorbignianus* habitante da bacia do Rio Grande-MG, encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção por efeitos da sobrepesca representando um

modelo perfeito para estudo com a água de coco em pó (VIEIRA, 2010).

A curimba, *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus brevis* são os únicos representantes da família *Prochilodontidae* onde o sêmen foi criopreservado em ACP-104 até o presente momento, sendo espécies muito apreciada pelo sabor de sua carne, e em algumas regiões pela utilização das ovas (MILIORINI et al., 2004).

A pirapitinga *Piaractus brachipomus* foi a espécie de characideo mais investigada quanto ao uso do ACP (MELO, 2010; PESSOA, 2010; NASCIMENTO, 2009; VELASQUEZ-MEDINA, 2008) (Tabela 2).

O tambaqui, *Colossoma macropomum* originário da bacia amazônica vem sendo superexplorado, porém o cultivo em cativeiro tem reduzido o impacto sobre as populações naturais. Além da criopreservação em ACP-104 por FARIAS et al. (1999); VIEIRA(2010) e LEITE (2011) a possibilidade de resfriamento do sêmen de tambaqui em ACP-104 foi investigada por OLIVEIRA, (2012) obtendo uma média de $49.25 \pm 1.00 \mu\text{m.s}^{-1}$ de velocidade curvilínea (VCL) e $61.31 \pm 2.03\%$ de espermatozoides móveis após 24 horas

de resfriamento contendo 10% de DMSO no diluidor.

A carpa comum, *Cyprinus carpio* nativa é um ciprinídeo, o qual se encontra ameaçado em sua diversidade devido a cruzamentos com espécimes

domesticados de maior resistência e melhor crescimento (MEMIS & KOHLMANN, 2006). Os primeiros resultados são favoráveis à criopresevação do sêmen de carpa em ACP-104 (LINHARES et al., 2012).

Tabela 2. Principais espécies de peixes de fertilização externa utilizadas na criopreservação do sêmen em meio à base de água de coco em pó (ACP-104).

| Ordem | família | Espécie | Referências |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|--|
| <i>Characiformes</i> | <i>Characidae</i> | <i>Bryconorbignianus</i> | VIVEIROS et al., 2008 |
| <i>Characiformes</i> | <i>Prochilodontidae</i> | <i>Prochiloduslineatus</i> | VIVEIROS et al., 2008 |
| <i>Characiformes</i> | <i>Anastomidae</i> | <i>Leporinuselongatus</i> | VIVEIROS et al., 2008 |
| <i>Characiformes</i> | <i>Characidae</i> | <i>Piaractusbrachipomus</i> | NASCIMENTO, 2008; VIVEIROS et al., 2010; VÉLASQUEZ-MEDINA, 2008; MELO, 2010 |
| <i>Characiformes</i> | <i>Characidae</i> | <i>Colossomamacropomum</i> | VIEIRA, 2010; LEITE, 2011 |
| <i>Cipriniformes</i> | <i>Ciprinidae</i> | <i>Cyprinus carpio</i> | CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 2002 LINHARES, 2012 |

Parâmetros cinéticos de espermatozoides criopreservados em ACP-104

O estudo da qualidade do sêmen criopreservado é importante do ponto de vista da fertilização artificial, pois os

espermatozoides necessitam ter uma velocidade capaz de alcançar a micrópila antes do seu fechamento.

Na atualidade, os diversos sistemas computadorizados de análise da qualidade seminal (CASA) podem

identificar mais de 15 parâmetros relativos ao comportamento cinético dos espermatozoides. Contudo a velocidade e o percentual de móveis têm sido os mais utilizados. Para o sêmen criopreservado em ACP-104, a média de motilidade observada nos diferentes estudos variou desde $13 \pm 2,0\%$ a $85 \pm 12\%$ (Tabela 3), enquanto a maior

velocidade (VCL) foi registrada por VIVEIROSet al. (2010) para o sêmen de *Prochilodus lineatus*, seguido por LINHARES et al. (2012) para o sêmen de carpa comum (Tabela3).As diferenças observadas podem estar relacionadas à espécie e conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Motilidade (% móveis) e velocidade ($\mu\text{m/s}$) de espermatozoides de peixes criopreservados em ACP-104 em diferentes taxas de diluição e ativados com NaCl 50 mM.

| Espécie | Diluição Pré-congelação | Diluição na ativação | Motilidade Espermática (%) | Velocidade Curvilinear ($\mu\text{m/s}$) | Referências |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|--|-------------------------|
| <i>Brycon orbygnianus</i> | 1:9 | 1:50 | 60,0 | (ND) | NASCIMENTO et al., 2007 |
| <i>Brycon orbygnianus</i> | 1:9 | 1:5 | $45,0 \pm 18,0$ | (ND) | VIVEIROS et al., 2008 |
| <i>Leporinus obtusidens</i> | 1:9 | 1:5 | $8,0 \pm 10,0$ | (ND) | VIVEIROS et al., 2008 |
| <i>Colossoma macropomum</i> | 1:3 | 1:25 | $56,18 \pm 5,29$ | $31,0 \pm 5,0$ | VIEIRA, 2010 |
| <i>Colossoma macropomum</i> | 1:4 | 1:20 | $20,3 \pm 1,7$ | $30,9 \pm 5,3$ | LEITE et al., 2011 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 1:1 | 1:250 | $59,8 \pm 12,5$ | $42,6 \pm 10$ | LINHARES et al., 2012 |
| | 1:3 | | $67,8 \pm 10,1$ | $46,5 \pm 7,3$ | |
| <i>Piaractus brachipomus</i> | 1:4 | 1:10 | $21,13 \pm 2,6$ | (ND) | PESSOA, 2009 |
| | 1:6 | | | | |
| <i>Piaractus brachipomus</i> | 1:4 | 1:50 | $20,97 \pm 8,17$ | (ND) | MELO, 2010 |
| | 1:6 | | $26,68 \pm 14,12$ | | |
| <i>Piaractus brachipomus</i> | 1:9 | 1:50 | $13,0 \pm 2,0$ | $30,0 \pm 3,0$ | VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008 |
| | | | $31,0 \pm 6,0$ | $24,0 \pm 2,0$ | |
| <i>Prochilodus lineatus</i> | 1:9 | 1:5 | $76,0 \pm 18,0$ | (ND) | VIVEIROS et al., 2008 |
| | 1:9 | 1:5 | $85,0 \pm 12,0$ | $53,7 \pm 25,1$ | VIVEIROS et al., 2010 |

Espécies: 1. *Brycon orbygnianus*; 2. *Prochilodus lineatus*; 3. *Colossoma macropomum*; 4. *Piaractus brachipomus*; 5. *Cyprinus carpio*; 6. *Leporinus obtusidens*. **ND:** Não determinado.

VIVEIROS et al. (2008) utilizando o mesmo protocolo para três diferentes espécies observaram a inadequação da mistura ACP+DMSO para *Prochilodus lineatus* e *Leporinus obtusidens* ao diluir 1:9 e ativar com NaCl, observando assim o efeito das combinações de ACP-104 com os crioprotetores metilglicol e DMSO sobre o percentual de espermatozoides móveis. A combinação de ACP-104 com DMSO foi eficiente apenas para *B. orbignyana* ($45 \pm 18\%$), enquanto a combinação de ACP-104 com metilglicol foi satisfatória tanto para *P. lineatus* quanto para *L. obtusidens* com taxas de motilidade superiores a 60%, confirmando a hipótese de que parece haver uma especificidade dos meios de criopreservação em relação à espécie, conforme observado por CHAO & LIAO (2001).

Para a pirapitinga, *Piaractus brachipomus* VELÁSQUEZ-MEDINA (2008) registrou motilidade pós-descongelção de $57 \pm 5\%$ quando congelado em ACP-104 + DMSO 10% diluído 1:3, com subpopulações de espermatozoides móveis ($12 \pm 2\%$ de rápidos, $20 \pm 2\%$ de médios e $25, \pm 1\%$ de lentos), porém, com baixos valores de VCL ($29 \pm 1 \mu\text{m/s}$). Todos os parâmetros de motilidade foram

significativamente inferiores ao controle (sêmen fresco), sem diferença significativa entre as taxas de diluição de 1:3 e 1:5.

MELO (2010) obteve médias próximas de 25% de motilidade quando espermatozoides de pirapitinga foram congelados em ACP-104 + DMSO ou ACP-104 + metilglicol não diferindo significativamente quando diluídos 1:4 ou 1:6, respectivamente; porém, significativamente superior ao diluente RINGER nas mesmas taxas de diluição ($p < 0,05$) quando congelados em *Dry Shipper*.

O sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus* em ACP-104 combinado com metilglicol resultou em $85 \pm 12\%$ de espermatozoides móveis, com resultados variando desde 73 ± 2 a $97 \pm 1\%$ entre os oito machos avaliados por (VIVEIROS et al., 2010), quando uma taxa de diluição de 1:9 foi utilizada e foram congelados em *Dry Shipper* (Tabela 3). Provavelmente, as diferenças observadas nos resultados de motilidade entre os diferentes experimentos estejam relacionados à maior capacidade de resistência dos espermatozoides de pirapitinga mantidos na região sudeste do Brasil, onde naturalmente permanecem em águas mais frias que os espécimes

mantidos na região semiárida do Nordeste do Brasil, devendo, entretanto,

Anormalidades espermáticas

A avaliação pós-descongelamento das anormalidades espermáticas é importante do ponto de vista da criopreservação de vez que espermatozoides danificados podem ser responsáveis pelo insucesso da fertilização. Conforme OHTA et al. (2001), para a competência espermática as estruturas celulares devem estar intactas e funcionais, contudo, a criopreservação pode causar alterações tanto nas dimensões quanto na forma da cabeça, peça intermediária e flagelo

LINHARES et al. (2012) observaram um aumento de 17,12% de anormalidades no sêmen criopreservado

Este valor foi inferior ao preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal que sugere a utilização de sêmen com índices de anormalidade de até 20%, em ovinos e

ser investigada esta hipótese.

comprometendo a função espermática e o potencial fertilizante, Assim, é essencial que esta avaliação seja feita antes e após descongelamento. A avaliação da morfologia espermática é feita desde a coloração vital com eosina/nigrosina (JENKINS et al., 2011), azul de bromofenol (OLIVEIRA, 2012) até mais recentemente o uso de marcadores moleculares com uso de corantes fluorescentes que detectam danos ao DNA e às mitocôndrias (HE; WOODS, 2004; SEGÓVIA et al., 2000).

de carpa comum em ACP-104, quando comparado ao sêmen fresco utilizando azul de bromofenol (Tabela 4).

suínos e de até 30% para bovinos e equinos (CBRA, 1998). Contudo, para peixes nenhum limite foi ainda estabelecido.

Além da avaliação subjetiva da morfologia dos espermatozoides, o sistema computadorizado conhecido como ASMA (Assisted Sperm Morphometry Analyser) avalia também a morfometria dos espermatozoides descrevendo mudanças nas dimensões dos espermatozoides provocadas por

processos como poluição, indução hormonal e criopreservação (MARCO-JIMENEZ et al., 2008). Estas informações são relevantes de vez que o tamanho e o formato da cabeça são conhecidos por estarem associados ao processo de fertilização (SAILER et al., 1996; HIRAI et al., 2001).

Tabela 4. Anormalidades observadas em espermatozoides de peixes criopreservados em água de coco em pó ACP-104.

| Espécies | Esptzs normais | Defeitos Cauda | Defeitos cabeça | Defeitos de peça intermediária | Referências |
|------------------------------|----------------|----------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------|
| <i>Piaractus brachipomus</i> | 56% | 32% | 5% | 4% | VELASQUEZ-MEDINA (2008) |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 78,16 ± 12,94 | 21,33 ± 13,26 | 0,16% ± 0,28 | | LINHARES et al., (2012) |

A morfometria de cabeça de espermatozoides de *Prochilodus lineatus* e *Colossoma macropomum* congelados em ACP-104 + DMSO em *Dry Shipper* e avaliados pelo ASMA revelaram um aumento significativo nas dimensões da cabeça em comparação ao sêmen fresco (MELO, 2010; LEITE, 2011).

Sabe-se que tanto as taxas de diluição utilizadas bem como a

osmolaridade da mistura diluente + crioprotetor podem influenciar no diâmetro da cabeça podendo interferir no processo de fertilização (MELO, 2010). Porém, os estudos sobre a fertilidade de espermatozoides de peixes congelados em ACP-104 realizados por NASCIMENTO et al. (2007), com o sêmen de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, ainda não investigaram o efeito deste aumento nas dimensões da

cabeça sobre os resultados da fertilização.

LEITE (2011) obteve taxas de fertilização de $52,12 \pm 3,59\%$ para espermatozoides de tambaqui congelados em ACP-104 + DMSO, mesmo com um percentual de móveis de apenas $28,9 \pm 5,8\%$, ressaltando ainda que houve um aumento nas dimensões da cabeça em relação aos espermatozoides frescos (Tabela5).

Contudo, NASCIMENTO et al. (2007) obtiveram taxas de fertilização de $85,4 \pm 14\%$ utilizando ACP-104 + metilglicol. Isto sugere que se houve aumento no tamanho da cabeça dos espermatozoides proporcionado pelo diluente ACP-104+metilglicol este não afetou as taxas de fertilização que foram comparáveis ao sêmen fresco.

Tabela 5. Características morfométricas de espermatozoides de peixes fresco e criopreservados em ACP-104 + DMSO.

| Características morfométricas Espécies | <i>Piaractus brachipomus</i> (1) | <i>Piaractus brachipomus</i> (1) | <i>Colossoma macropomum</i> (2) | <i>Colossoma macropomum</i> (2) |
|--|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Fresco | criopreservado | fresco | criopreservado |
| Área | $7,72 \pm 0,53$ | $8,56 \pm 0,63$ | $7,59 \pm 0,3$ | $8,60 \pm 0,5$ |
| Largura | $2,39 \pm 0,04$ | $2,71 \pm 0,05$ | $2,76 \pm 0,1$ | $2,95 \pm 0,2$ |
| Comprimento | $3,48 \pm 0,14$ | $3,53 \pm 0,13$ | $3,05 \pm 0,1$ | $3,26 \pm 0,3$ |
| Perímetro | $10,06 \pm 0,44$ | $10,47 \pm 0,38$ | $9,67 \pm 0,2$ | $10,35 \pm 0,3$ |
| Elipticidade | $1,45 \pm 0,03$ | $1,33 \pm 0,04$ | $1,1 \pm 0,00$ | $1,09 \pm 0,01$ |
| Elongação | $0,179 \pm 0,006$ | $0,1305 \pm 0,0087$ | $0,06 \pm 0,03$ | $0,05 \pm 0,02$ |

¹ MELO, (2010)

² LEITE, (2011)

VIVEIROS et al. (2010) obtiveram taxas de fertilidade em ACP-104 de $48 \pm 12\%$ quando o sêmen de *P. lineatus* foi congelado em ACP-104, porém com VCL de $53,7 \pm 25,1 \mu\text{m/s}$.

Métodos de congelação do sêmen de peixes de fertilização externa em ACP-104.

Os métodos de congelação são conhecidos por afetarem o sucesso da

criopreservação de espermatozoides. A maioria dos estudos com ACP-104 têm utilizado o *Dry shipper* e a rampa em caixas de isopor (Tabela 6).

O *Dry shipper* é um botijão de transporte contendo vapores de nitrogênio onde as palhetas são imersas diretamente. O método é fácil, prático e mais rápido na execução do protocolo, contudo os resultados diferem entre as

espécies, com taxas de fertilização variando de $48 \pm 12\%$ a $85 \pm 14\%$ e deste modo com alguns resultados comparáveis ao sêmen fresco (NASCIMENTO et al. (2007). A maioria dos estudos com ACP-104 utilizou o *Dry Shipper* como método rápido de congelação, porém a utilização de rampa em caixa de isopor também foi testada (Tabela 6).

Tabela 6. Métodos de congelação do sêmen de peixes de fertilização externa em ACP-104.

| Equipamento de congelação | Taxas de diluição | Tipo de palheta | Crioprotetor | Referências |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|
| Dry shipper | 1:9 | 0,5mL | Metilglicol | VIVEIROS et al., 2008 |
| Dry shipper | 1:9 | 0,5mL | Metilglicol | NASCIMENTO et al., 2010 |
| Dry shipper | 1:9 | 0,5mL | Metilglicol | VIVEIROS et al., 2010 |
| Dry shipper | 1:4 e 1:6 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | MELO, 2010 |
| Dry shipper | 1:4 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | LEITE, 2011 |
| DRY shipper | 1:3 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | LINHARES, 2012 |
| Dry shipper | 1:3 | 0,25mL | Dimetil sulfóxido | LINHARES, 2012 |
| Dry shipper | 1:3 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | VÉLASQUEZ- MEDINA, 2008 |
| Rampa | 1:3 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | VÉLASQUEZ-MEDINA, 2008 |
| Rampa | 1:3 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | VIEIRA, 2010 |
| Rampa | 1:3 | 0,5mL | Dimetil sulfóxido | LINHARES, 2012 |
| Rampa | 1:3 | 0,25mL | Dimetil sulfóxido | LINHARES, 2012 |

O diferentes estudos que compararam os métodos de congelação em *Dry Shipper* com a caixa de poliestireno (isopor com rampa de congelação) (LINHARES et al., 2012; VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008) utilizando ACP-104 como diluente demonstraram que não houve diferenças com relação à motilidade e velocidade. Entre os equipamentos testados.

A congelação do sêmen de tambaqui, *Colossoma macropomum* em ACP-104 + DMSO a 10% resultou em $56,18 \pm 5,29\%$ e 39% de motilidade, (VIEIRA, 2010; Leite, 2012) respectivamente com VCL de $30,1 \pm 3,2$ $\mu\text{m/s}$ (LEITE, 2012).

A diferença entre os resultados pode ser devido ao método de congelação utilizado, já que VIEIRA (2010) utilizou caixa de isopor com rampa distante 3 cm da superfície do nitrogênio líquido para congelação, enquanto LEITE (2012) utilizou o *Dry Shipper* com imersão direta em vapores de nitrogênio.

O sêmen criopreservado em ACP-104 adicionado de metilglicol resultou em taxas de fertilização comparáveis ao sêmen fresco tanto para a piracanjuba, *Bryconorby gnianus* quanto para o sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachipomus* e curimba,

Prochilodus lineatus (VIVEIROS et al., 2010). Atualmente o curimba encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção na Bacia do Rio Grande - Minas Gerais (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

Considerações finais

Até o presente momento os estudos com ACP-104 em teleósteos de fertilização externa estão mais concentrados na análise da associação com DMSO ou metilglicol, taxas de diluição e soluções ativadoras. O crioprotetor que mostrou melhores resultados de motilidade foi o metilglicol na concentração de 10% (VIVEIROS et al., 2008; 2010). Foi demonstrado não haver diferença significativa entre taxas de diluição muito próximas com relação ao percentual de móveis, confirmando os resultados da literatura. A melhor combinação tem sido ACP-104 + DMSO na proporção de 1:3, enquanto na diluição 1:9 o melhor resultado observado foi para o ACP-104 + metilglicol a 10%. Entretanto, quanto a parâmetros cinéticos como a VCL, as médias encontradas têm sido inferiores a 50 $\mu\text{m/s}$, com exceção de Viveiros et al. (2010) que obtiveram VCL de $53,7 \pm 25,1$ $\mu\text{m/s}$ para o sêmen de pirapitinga. Deste modo novos estudos deverão ser

realizados no intuito de se encontrar um protocolo capaz de fornecer parâmetros cinéticos compatíveis com o sêmen fresco.

Conforme observado, a diversidade dos protocolos testados dificultam as comparações. Porém, os dados obtidos sugerem que as diferenças observadas podem estar relacionadas às interações entre o método de congelamento (rampa ou *Dry Shipper*) com o tipo de palheta e as taxas de diluição pós-descongelamento para ativação dos espermatozoides, bem como à própria espécie em particular. Deste modo, os estudos devem prosseguir em cada espécie para aperfeiçoamento dos protocolos.

Referências Bibliográficas

AKÇAY, E.; BOZKURT, Y.; SEÇER, S.; TEKIM, N. Cryopreservation of Mirror Carp Semen. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.28, p.837-843, 2004.

<http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-04-28-5/vet-28-5-9-0211-37.pdf>. Manuscript code VET-0211-37.

AROUCHA, E.M.M.; VIANNI, R. Determinação de ácido ascórbico na água de coco (*Cocos nucifera* L.) por cromatografia líquida e pelo método titulométrico. **Rev. Ceres**, Viçosa/MG, v.49, n.283, p.245-251, 2002.

<http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V49N283P15102.pdf>

AROUCHA, E.M.M.; QUEIROZ, R. F.; NUNES, G.H.S.; TOMAZ, H.V.Q. Qualidade pós-colheita do coco anão verde submetido ao recobrimento com parafina, durante a armazenagem refrigerado. **Rev. Biol. Ciên. Terra**, v.6, n.2, p.42-49, 2006. ISSN 1519-5228.

<http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V49N283P15102.pdf>

CARVALHO, M.A.M. Água de coco em pó na criopreservação do sêmen de peixes. Dissertação mestrado (Engenharia de pesca). 69f. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F.; GONDIM, J.M. Prolongamento da motilidade de espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Cocos nucifera* L.) como diluidor de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.5, p.184-186, 2002.

CHAO, N.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189. 2001.

[doi:10.1016/S0044-8486\(01\)00586-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00586-5)

<http://ac.els-cdn.com/>

[S0044848601005865/1-s2.0-](http://ac.els-cdn.com/S0044848601005865/1-s2.0-)

[S0044848601005865-main.pdf?tid=](http://ac.els-cdn.com/S0044848601005865-main.pdf?tid=)

[6538b37c-c28e-11e4-b4db-00000aab0f6b&acdnt=1425487936 fff65886efc807d68c9d6e11b3a300fa](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01815.x)

CHRIST, S.A.; TOTH, G.P.; MCCARTHY, H.E et al. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). **J. Fish. Biol.**, v.48, p.1210-1222, 1996. doi: 10.1111/j.1095-8649.1996.

[tb01815.xhttp://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1095-8649.1996.tb01815.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_EXPIRED](http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1095-8649.1996.tb01815.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_EXPIRED)

FARIAS, J.O.; CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, conservado em água de coco. **Rev. Ciên. Prod. Anim.**, v.1, p.44-58, 1999. ISSN on line 21764158 <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/rcpa/article/view/7>

HE, S.; WOODS, L.C. III. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiol.**, v. 48, p. 254–262, 2004.

[doi:10.1016/j.cryobiol.2004.01.009](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.009)

ISSN: 0011-2240. Disponível em http://ac.els-cdn.com.ez76.periodicos.capes.gov.br/S0011224004000318/1-s2.0-S0011224004000318-main.pdf?_tid=33274e16-c1cb-11e4-b49d-00000aab0f02&acdnt=1425404100_6d51ced95eafec069b5e1104fad52713

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A.; WOLF, E.; FÖLL, J.; AUMÜLLER, R.; BRAUN, J. Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head Morphometry in Boars (*Sus scrofa*): Relation to Fertility and Seminal Plasma Growth Factors. **J. Androl.**, Vol. 22, No. 1, January/February 2001. ISSN:0196-3635. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02159.x/pdf>

IRAWAN, I.; VUTHIPHANDCHAIA, V.; NIMRAT, S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v.122, p.236-243, 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.017.

disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S037843201000401X/1-s2.0-S037843201000401X-main.pdf?tid=a8db181c-c1d1-11e4-b744-00000>

[aacb35f&acdnat=1425406875_0d5e5fb8c13b3c3e88c93fe607275d31](http://www.reproduction-online.org/content/141/1/55.full.pdf)
JENKINS, J.A.; EILTS, B.E.; GUITREAU, A.M.; FIGIEL, C.R.; DRAUGELIS-DALE, R.O.; TIERSCH, T.R. Sperm quality assessments for endangered razorback suckers *Xyrauchen texanus*. **Reproduction**, v.141 p.55–65. 2011. doi: 10.1530/REP-10-0153 On line ISSN: 1741-7899. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/content/141/1/55.full.pdf>
LEITE, L.V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocument/s/lilianeveras.pdf>.
LINHARES, F.R.A. **Efeito de diferentes taxas de diluição e protocolos de congelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum (*Cyprinus carpio*) criopreservados em água de coco em pó (ACP-104)**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará. 2012. Disponível em:

http://www.uece.br/ppgcv/dmdocument/s/renan_aragao.pdf
LINHARES, F.R.A.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M; LOPES, J.T.; PINHEIRO, R.R.R.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Anormalidades em espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio*, frescos ou criopreservados em diluidor a base de água de coco em pó (ACP-104®). VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal. **Ciência Animal**, Supl., v. 12, p. 671–674, 2012. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/peixes.pdf>
MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia do Alimento**, v. 25, n. 1, p. 72-77, 2005. On-line ISSN 1678-457X. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n1/a11v25n1>
MARCO-JIMENÉZ, F.; PEÑARANDA, D.L.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; MYLONAS, C.C.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Morphometric characterization of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa

using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA). **J. Appl. Ichthyol.** v. 24,n.4, p. 382–385, 2008.

doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01135

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0426.2008.01135.x/epdf>

MELO, M.A.P. **Morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) criopreservados utilizando água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

http://www.uece.br/ppgcv/dmdocument/monicaaline_melo.pdf

MEMIS, D.; KOHLMANN, K. Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio*) from Turkey. **Aquaculture**, v. 258, p. 257–262, 2006. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.03.041 http://ac.els-cdn.com/S0044848606002389/1-s2.0-S0044848606002389-main.pdf?tid=4bf99fd2-c1d7-11e4-b36200000aab0f6b&acdnat=1425409296_deaa0cad06a9c04255af0804a491e4d2.

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A. T. M. et al. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL

REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: 2004. p.523.

NASCIMENTO, A.F.; ISAÚ, Z.A.; VIVEIROS, A.T.M.; CARVALHO, M. A.M.; SALGUEIRO, C.C.M. Fertilidade do sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* criopreservado em água de coco em pó e em BTS®. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, ENCONTRO DE PISCICULTORES DE MATO GROSSO DO SUL, 1., 2007. **Anais...** Cuiabá, 2007.

NASCIMENTO, A.F. **Motilidade espermática de sêmen de peixes criopreservado em diferentes meios avaliada por métodos subjetivo e computadorizado**. 54f. UFLA. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. Disponível em:

http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1903/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Motilidade%20esperm%C3%A1tica%20de%20s%C3%AAsmen%20de%20peixes%20criopreservado%20em%20diferentes%20meios%20avaliada%20por%20m%C3%A9todo%20subjetivo%20e%20computadorizado.pdf.

NASCIMENTO, A.F.; MARIA, A.N.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A. M.; VIVEIROS, A.T.M. Out-of-season

sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Anim. Reprod. Sci.**, v.118, p.324-329, 2010. Disponível em: [doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.07.002).

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009001845>

NUNES, J.F. A inseminação artificial Como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. [artificial insemination with an alternative method to improve milk production in goats]. Proceedings of the Caprine Culture Symposium of Rio De Janeiro State: Niterói; 1986.

OHTA, H.; KAWAMURA, K.; UNUMA, T.; TAKEGOSHI, Y. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. **J. Fish Biol.**, v.58 p.670–681. 2001. (doi:10.1111/j.1095-8649.2001.tb00521.x).

OLIVEIRA, F.C.E. **Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada à crioprotetores - estudo de toxicidade**. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

PATENTES ON LINE. Beneficiamento do líquido endospermico do coco para produção de água de coco em pó (ACP).

p.1. 2004. No. Patente: PI0401254-2. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/beneficiamento-do-l-liquido-endosp-rmico-do-coco-para-produ-o-de-gua-de-coco-em-p-acp-117438.html>.

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**. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

PINHEIRO, R.R.R.; JORGE, J.C.M.; SOUZA, M.E.M.; CARVALHO, M.A. M.; LINHARES, F.R.A.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Características do sêmen fresco de carpa comum (*Cyprinus carpio*) em latitude equatorial. **Ciê. Anim., Supl.** v.12, p.695-697. 2012.

<http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/peixes.pdf>

RESENDE, J.M. **Revestimentos biodegradáveis para a conservação de coco “anão verde”**. Campinas, 2007. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, 2007. Disponível em:

<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000440579&opt=1>

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P., 1996: Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, v. 24, p.167–173, 1996. ISSN:0196-4763.

doi:10.1002/(SICI)1097-0320

(19960601)24:2<167::AID-CYTO9

>3.0.CO; 2-G. Disponível em:

<http://onlinelibrary-wiley-com.ez76>.

Periódicos.capes.gov.br/doi/10.1002/(SICI)1097-0320(1996060

1)24:2%3C167::AID-CYTO9%3E3.0.

CO; 2-G/epdf

SEGOVIA, M.; JENKINS, J.A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T.R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, v.53, p.1469-1499, 2000. doi:10.1016/S0093-

691X(00)00291-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898218>.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Água de coco em pó em técnicas da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, n.22, v.1, p.20-32, 2012 – Edição Especial. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdo>

cuments/CONERA_PALESTRA%20%282%29.pdf

SALLES M.G.F. Água de coco (*Cocos nucifera*L.) in natura, sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino [in natura coconut water (*Cocos nucifera* L.) in gel and stabilized as a caprine semen extender] Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine) – Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1989. 68 pp.

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SANTOS, E. A. A.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v.76, p. 1084-1089, 2011.

SULTANA, M.; NAHIDUZZAMAN, M.; HASSAN, M.M.; KHANAM, M.U.H.; HOSSAIN, M.A.R. Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. **Univ. J. Zool. Rajshahi**, v.28, p.51-55. 2010.

<http://journals.sfu.ca/bd/index.php/UJZRU>. DOI: 10.3329/ujzru.v28i0.5287.

Disponível em:

<http://www.banglajol.info/index.php/UJZRU/article/view/5287/4133>

UCHOA, D.C. Inseminação artificial em cadáveres com sêmen a fresco com diluidores à base de água de coco [artificial insemination in bitches with fresh semen in coconut water extenders]. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). State University of Ceara, Fortaleza. 2004, 61 pp. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/index.php/dissertacoes>

VELÁSQUEZ-MEDINA, S.P. **Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachipomus* (Pisces, Characidae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2008. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4930/1/Sandra%20Velasquez.pdf>

VIEIRA, M.J.A.F. **Caracterização do sêmen de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), e criopreservação em diluentes a base de água de coco em pó (ACP-104).** Fortaleza, 2010. 115p. II. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010. Disponível em: http://www.uece.br/ppgcv/dmdocument/marcelo_vieira.pdf

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. p.137–150. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10695-008-9240-3#page-2>

VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; ORFÃO, L.H.; CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F. Powder coconut water ACP-104 as extender for semen cryopreservation of brazilian migratory fish species. Paris: **Cybiu—Int J. Ichthyol** 2008:32:215. Disponível em: <http://sfi.mnhn.fr/cybiu/numeros/2008/322%20suppl%20ISRPF/06-Gametogenesis%20and%20gamete%20biology/102-Viveiros%20P137.pdf>

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H.; ISAÚ, Z.A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v.74, n.4, p.551-556, 2010. Disponível em: http://ac.els.cdn.com.ez76.periodicos.capes.gov.br/S0093691X10001780/1-s2.0-S0093691X10001780main.pdf?_tid=e3b200d4-c1ab-11e4-8e06-0000aacb362&acdnat=1425390653_11944361516a5cb4c0805d6606544c98

VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.;
NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.;
CANEPPELE, D. Effects of extenders,
cryoprotectants and freezing methods
on sperm quality of the threatened
Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-
sul *Brycon opalinus* (Characiformes).
Therio., v.78, p.361-368. 2012.
Disponível em: [http://ac.els-
cdn.com/S0093691X12001069/1-s2.0-
S0093691X12001069main.pdf? tid=08
721b86-c1aa-11e4-b929-00000aab0f6b
&acdnat=1425389855 5dc5583bcf5f42
abf9d92e1bf5d37126](http://ac.els-cdn.com/S0093691X12001069/1-s2.0-S0093691X12001069main.pdf?tid=08721b86-c1aa-11e4-b929-00000aab0f6b&acdnat=1425389855_5dc5583bcf5f42abf9d92e1bf5d37126)