



ZIARA APARECIDA ISAÚ

**ANÁLISE ESTRUTURAL DOS OVÓCITOS,
FERTILIZAÇÃO E EMBRIOGÊNESE E OS
EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN
SOBRE A MOTILIDADE, EMBRIOGÊNESE E
CRESCIMENTO LARVAL EM PIABANHA,
Brycon insignis (CHARACIFORMES)**

LAVRAS - MG

2011

ZIARA APARECIDA ISAÚ

**ANÁLISE ESTRUTURAL DOS OVÓCITOS, FERTILIZAÇÃO E
EMBRIOGÊNESE E OS EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN SOBRE A MOTILIDADE, EMBRIOGÊNESE E
CRESCIMENTO LARVAL EM PIABANHA, *Brycon insignis*
(CHARACIFORMES)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Isaú, Ziara Aparecida.

Análise estrutural dos ovócitos, fertilização e embriogênese, e os efeitos da criopreservação do sêmen sobre a motilidade, embriogênese e crescimento larval em piabanha, *Brycon insignis* (Characiformes) / Ziara Aparecida Isaú. – Lavras : UFLA, 2011.
122 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Bloqueio a poliespermia. 2. Desenvolvimento embrionário. 3. CASA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3752

ZIARA APARECIDA ISAÚ

**ANÁLISE ESTRUTURAL DOS OVÓCITOS, FERTILIZAÇÃO E
EMBRIOGÊNESE E OS EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN SOBRE A MOTILIDADE, EMBRIOGÊNESE E
CRESCIMENTO LARVAL EM PIABANHA, *Brycon insignis*
(CHARACIFORMES)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2011

Dra. Elizete Rizzo

ICB/UFGM

Dr. Paulo dos Santos Pompeu

DBI/UFLA

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

DZO/UFLA

Dr. Marcelo de Castro Leal

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

Orientadora

LAVRAS – MG

2011

“Tudo o que fizerem, seja em palavra ou em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai.” Apost Paulo Cl 3:17

Dedico este trabalho ao meu Senhor e Deus, criador de todas as coisas, que me concedeu o privilégio de conhecer um pouco do grandioso mistério chamado VIDA.

Por me dar o dom da vida e me ajudar a chegar até aqui.

A ELE seja todo louvor, toda honra e toda glória!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que com seu amor, apoio e incentivo me deram forças pra concluir mais esta etapa em minha vida.

A minha orientadora e amiga, Ana Viveiros, exemplo de mestre e pesquisadora, por acreditar na minha capacidade, pela atenção, dedicação e carinho ao me orientar neste trabalho e nos períodos de Docência Voluntária.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

À Prof^a Elizete Rizzo, pelos conhecimentos compartilhados durante a realização deste trabalho, atenção e colaboração na escrita e correção dos artigos. Aos colegas do Laboratório de Ictiohistologia, à Mônica por auxiliar na preparação das lâminas, à Flávia pela amizade e acolhida, muito obrigada.

Ao Dr Marcelo Castro Leal, pela colaboração na correção dos artigos.

Ao Rev. Algernon Paiva Filho, a quem amo como um pai, por todo amor, carinho, atenção, dedicados a mim e minha família, todos os conselhos, incentivo e amizade e aos demais pastores que acompanharam e me abençoaram durante esta caminhada, Rev. Lucas Magalhães e Rev. Hebert Quaresma, meu muito obrigada!

À irmã Ana Cristina Paiva, pela amizade, carinho e incentivo. Você sempre será um exemplo pra mim.

Aos irmãos em Cristo da Segunda Igreja Presbiteriana de Lavras, que me incentivaram e oraram comigo e por mim, que Deus os abençoe sempre.

Às amigas e colegas de trabalho, Laura H. Orfão e Thiciana B. Amaral pelo companherismo e cumplicidade nos bons e maus momentos. As amigas da iniciação científica: Natália, Isabel e Thatijanne pelo precioso auxílio nos experimentos, que tornou possível a realização deste trabalho. Aos colegas do grupo de pesquisa: Ariane, Antonio, Rafael e Mariana pelo apoio.

À Companhia Energética de São Paulo (CESP), por disponibilizar os reprodutores e as instalações da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna-SP. Ao amigo Danilo Caneppele, por toda sua compreensão, colaboração e empenho que fizeram com que este trabalho fosse possível. A toda equipe da Estação: Benedito P. Barros, Edmur Donola, Diego Rodrigues Ielzo Luís da Silva, Júlio Cesar, Lúcia Cancio, Milton Miranda, Vicente de Paula Martins, e Willian Trindade pelo auxílio e colaboração valiosos.

À Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG - projetos: CVZ 1609-06; APQ 2578-5-04-07; CAEG APQ 02715-02) e à Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL - projeto: 0061-017/2006), pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo: 141748/2008-7), pelo apoio financeiro.

A todos que, por um momento de descuido e esquecimento indesculpável não foram citados, mas que contribuíram sobremaneira para que eu pudesse chegar até aqui, e que merecem minha eterna gratidão.

Muito obrigada!

RESUMO

A piabanha *Brycon insignis* é uma espécie nativa e endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul. Ao longo dos anos esta bacia vem sofrendo com represamentos, desmatamento da mata ciliar e poluição fazendo com que muitas espécies, incluindo a *B. insignis* estejam ameaçadas de extinção. A criopreservação de sêmen pode ser uma ferramenta útil na fertilização artificial e programas de recuperação de estoques ameaçados. Contudo, os efeitos do uso de sêmen criopreservado sobre o desenvolvimento embrionário, sobrevivência e desenvolvimento da progênie ainda não estão claros. Neste estudo, procurou-se aprofundar o conhecimento sobre os eventos pós-fertilização e embriogênese nesta espécie, através de análise ao microscópio eletrônico e estereomicroscópio (artigo 1), bem como avaliar o efeito da criopreservação do sêmen na qualidade espermática, embriogênese e desenvolvimento da progênie até 112 dias (artigo 2). O sêmen foi criopreservado em meio contendo metil glicol e BTS[®] (Minitube do Brasil), em palhetas de 0,5 mL, no congelador de vapor de nitrogênio *dry-shipper* e descongelado em banho maria a 60°C. Sete estágios de desenvolvimento embrionário foram observados: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, larval e eclosão. O sêmen criopreservado apresentou menores taxas de motilidade e de vigor espermático (53%, escore 3) em relação ao sêmen fresco (100% e escore 5). Apesar da diminuição na qualidade espermática, não houve diferença quanto ao desenvolvimento embrionário entre as progênies originadas do sêmen criopreservado em relação ao fresco (24% dos embriões estavam em estágio de gastrulação 10 h após a fertilização), nem quanto à taxa de eclosão (24%). O percentual de larvas normais (88-97%) foi semelhante entre as progênies. As larvas se desenvolveram de forma semelhante nas duas progênies, passando de 1,3 cm e 0,03 g aos 7 dias após a eclosão, para 13,8 cm e 45,9 g aos 112 dias após a eclosão. Os resultados obtidos são relevantes por aprofundar o conhecimento sobre os eventos da fertilização e embriogênese e por demonstrar que o desenvolvimento embrionário, larval e crescimento da progênie até 112 dias desta espécie não sofreu interferência do uso do sêmen criopreservado. Assim sêmen de piabanha criopreservado de acordo com o método descrito pode ser utilizado na rotina das pisciculturas para facilitar a reprodução artificial, formar um banco de germoplasma e preservar a variabilidade genética dessa espécie.

Palavras-chave: Criopreservação. Embriogênese. Crescimento Larval. Sêmen. *Brycon insignis*.

ABSTRACT

The piabanha *Brycon insignis* is a native and endemic species of the Paraíba do Sul river basin. Over the past years, this basin has suffered with hydroelectric dams, deforestation and pollution leading to threat many species, including *B. insignis*. Sperm cryopreservation can be a useful tool in artificial fertilization programs, and recovery of threatened stocks. However, the effects of the cryopreserved sperm on embryonic development, survival and on the progeny development are still unclear. Thus, this study aimed at investigating the post-fertilization events and embryogenesis in this species under scanning electron microscopy and stereomicroscopy (article 1), as well to evaluate the effects of sperm cryopreservation on sperm quality, embryogenesis and development of progeny up to 112 days (article 2). Sperm was cryopreserved in a medium containing methylglycol and BTS™ (Minitube do Brasil), in 0.5-mL straws, in a vapor nitrogen freezer *dry-shipper* and thawed in a water bath at 60°C. Seven stages of development were observed: zygote, cleavage, blastula, gastrula, segmentation, larval and hatching. Cryopreserved sperm yielded lower rates of motility and quality motility score (53%, score 3) compared to sperm (100%, score 5). Despite the decrease in sperm quality, no difference on embryo development among the progeny originated from cryopreserved or fresh sperm (24% embryos were at the gastrula stage 10 h post-fertilization), or on the hatching rate (24%). The percentage of normal larvae (88-97%) was similar between the progenies. Larvae developed similarly in both progenies, from 1.3 cm and 0.03 g at 7 days post-hatching up to 13.8 cm and 45.9 g at 112 days post-hatching. The results are relevant for advancing knowledge concerning the fertilization events and embryogenesis stages, and for demonstrating that the embryonic development and larval growth were not affected by the use of cryopreserved semen. Thus, cryopreserved sperm of piabanha can be used to facilitate artificial reproduction in fish farms and for gene banking to preserve the species genetic variability.

Keywords: Cryopreservation. Embryogenesis. Larval growth. Sperm. *Brycon insignis*.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exemplar de <i>B. Insignis</i> , popularmente conhecida como piabanha	17
Figura 2	Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul	19
Figura 3	Equipamentos que compõe o sistema CASA (computer-assisted sperm analysis) - um microscópio óptico de contraste de fase com câmera acoplada, conectado a um computador com o software instalado	26
Figura 4	Planilha com o laudo de uma análise espermática emitido via CASA	27
Figura 5	Eletromicrografia de ovócito de <i>Brycon nattereri</i>	31
Figura 6	Resumo dos mecanismos de bloqueio a poliespermia em ovos de peixes.....	33
Figura 7	Breve comparação do processo de fertilização entre mamíferos e peixes	34
Figura 8	Zigoto	35
Figura 9	Clivagem	36
Figura 10	Blástula	37
Figura 11	Gástrula - 30, 50 e 90% de epibolia, respectivamente	38
Figura 12	Segmentação	39
Figura 13	Estágios larval e de eclosão respectivamente	40
Figura 14	Resumo e estrutura da tese	42

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1	Scanning electron micrographs of the oocyte surface of tiete tetra <i>Brycon insignis</i>	65
Figura 2	Scanning electron micrographs of some post-fertilization events in tiete tetra <i>Brycon insignis</i>	66
Figura 3	Stages of embryogenesis of tiete tetra <i>Brycon insignis</i> , observed under stereomicroscopy.	72

ARTIGO 2

Figura 1	Percentage of embryos ($n = 240$; mean \pm SE) at the cleavage and gastrula (> 90% epiboly.) stages, hatching rate and normal hatched larvae of tiete tetra <i>Brycon insignis</i>	104
Figura 2	Larvae of tiete tetra <i>Brycon insignis</i>	105

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Tipos de container, métodos de congelamento e de descongelamento em banho-maria utilizados na criopreservação de sêmen de espécies de peixes do gênero <i>Brycon</i>	23
Tabela 2	Diluidores, crioprotetores e taxas de diluição utilizados na criopreservação de sêmen de peixes do gênero <i>Brycon</i> , que produziram melhores resultados em cada estudo	24
Tabela 3	Padrão de adesividade dos ovócitos e comportamento reprodutivo em peixes da ordem Characiformes	30

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1	Female body weight and oocytes characteristics (n = 8 females) of tiete tetra <i>Brycon insignis</i> after hormone treatment	64
Table 2	Seconds post-fertilization when some post-fertilization events were first observed in species of the genus <i>Brycon</i> ..	67
Table 3	Hours post-fertilization when the embryonic development stages were first observed in species of the genus <i>Brycon</i> ..	68

ARTIGO 2

Table 1	Male body weight and quality of fresh sperm (n = 15 males; mean \pm SD; minimum-maximum values) of tiete tetra <i>Brycon insignis</i> after hormone treatment	102
----------------	---	-----

Table 2	Motility features (n = 6 males; mean ± SD) of fresh sperm (subjective evaluation) and sperm cryopreserved (subjective and CASA) in methylglycol and BTS™ of tiete tetra <i>Brycon insignis</i>	103
Table 3	Standard length (SL) and body weight (BW) (mean ± SD) of progenies originated from fresh sperm and sperm cryopreserved in methylglycol and BTS™ at 7, 30, 60, 112 days post-hatching (DPH) of tiete tetra <i>Brycon insignis</i>	106

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Brycon insignis</i>	17
2.2 Criopreservação de sêmen.....	20
2.3 Superfície de ovócitos de peixes da ordem Characiformes.....	28
2.4 Fertilização em teleósteos	31
2.5 Embriogênese	34
3 OBJETIVO E ESCOPO DA TESE	41
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	45
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	51
ARTIGO 1 STRUCTURAL ANALYSIS OF OOCYTES, POST-FERTILIZATION EVENTS AND EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE BRAZILIAN ENDANGERED TELEOST <i>Brycon insignis</i> (CHARACIFORMES)	51
ARTIGO 2 DOES SPERM CRYOPRESERVATION INTERFERE ON MOTILITY, EMBRYOGENESIS AND LARVAL GROWTH OF NEOTROPICAL FISH TIETE TETRA, <i>Brycon insignis</i>?	88

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies nativas, existindo ainda muitas desconhecidas (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). Entre elas pelo menos 40 espécies, de várias famílias, têm sido tradicionalmente utilizadas ou apresentam potencial para aqüicultura. Fazem parte desta lista várias espécies da família Characidae entre elas, sete espécies do gênero *Brycon*, incluindo a piabanha *B. insignis* (GODINHO, 2007).

A piabanha, também conhecida como tiete tetra (em inglês, (FROESE; PAULY, 2010) é uma espécie nativa e endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul, cujo percurso inicia no município de Paraibuna (SP), a partir da confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, e atravessa o Rio de Janeiro de sul a norte desaguando em Atafona (RJ) percorrendo um total de cerca de 1.000 km. Na década de 50, o rio Paraíba do Sul e seus afluentes foram considerados um dos mais piscosos do Estado de São Paulo. Apesar da grande diversidade de peixes, poucos possuíam valor comercial, entre estes se destacavam principalmente a piabanha *Brycon insignis*, surubim-do-paraíba *Steindacneridion parahybae*, piavas *Leporinus sp.*, piapara *Leporinus sp.* e o robalo *Centropomus sp.* (MACHADO; ABREU, 1952). Ao longo dos anos, a bacia do rio Paraíba do Sul vêm sofrendo represamentos, desmatamento da mata ciliar e poluição em razão da industrialização e atividade agrícola regional. O impacto ambiental destas ações antropogênicas têm resultado numa diminuição da diversidade da fauna pesqueira na região, fazendo que muitas espécies, incluindo a *B. insignis* sejam incluídas na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (ROSA; LIMA 2008).

Considerando a necessidade de repovoamento dos ambientes aquáticos, a reprodução artificial se faz necessária. No entanto, para que esta seja bem sucedida é importante um bom conhecimento sobre a biologia da espécie principalmente em se tratando de uma espécie migradora, como a piabanha, que carece de indução hormonal para liberação de ovócitos e facilitar a espermição. Durante o processo de reprodução artificial em cativeiro, um aspecto muito importante para o manejo das progênes é o conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário e larval da espécie; uma informação valiosa para pesquisas relacionadas ao cultivo, uma vez que fornece informações adicionais sobre o ciclo de vida da espécie.

Nos programas de repovoamento e expansão da piscicultura, a criopreservação de sêmen é uma ferramenta que pode ser bastante útil para reprodução artificial. Entre as diversas vantagens de seu emprego nas pisciculturas, podem ser citadas a redução do número de reprodutores, a eliminação de problemas de assincronia da maturidade gonadal entre machos e fêmeas e as falhas na indução hormonal. Os espermatozoides da grande maioria das espécies de peixes são imóveis no plasma seminal e precisam entrar em contato como a água no meio exterior para adquirirem motilidade. A fim de se permitir a conservação do sêmen deve se evitar a ativação pré-matura pelo contato com água ou urina e utilizar diluidores com osmolaridade semelhante ao plasma seminal e crioprotetores adequados. Desde o primeiro estudo bem sucedido de criopreservação de sêmen de peixe (BLAXTER, 1953) vários pesquisadores se dedicaram a estudar e aprimorar essa técnica, inclusive no Brasil. Em *Brycon insignis* dois estudos foram feitos recentemente testando meios e protocolos de congelamento diferentes (SHIMODA, 2004; VIVEIROS et al., 2010). Na maioria das vezes, a qualidade do sêmen após o descongelamento é avaliada em função da porcentagem de células móveis observada em microscópio de luz. Contudo, durante a última década, o uso de

um sistema de análise espermática assistida por computador, conhecido como “CASA” (do inglês *computer-assisted sperm analysis*) tem se tornado cada vez mais popular em laboratórios de tecnologia de sêmen por permitir uma avaliação mais precisa da motilidade, além de outros parâmetros de qualidade do sêmen. Além disso, estudos recentes têm sido publicados visando avaliar características das progênes oriundas da fertilização com sêmen criopreservado, tais como: malformação, ploidia, e sobrevivência larval (HAYES et al., 2005; HORVÁTH et al., 2007; LINHART; RODINA; COSSON, 2000; MISKOLCZI et al., 2005; YOUNG et al., 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Brycon insignis*



Figura 1 Exemplar de *B. Insignis*, popularmente conhecida como piabanha

Brycon insignis (Steindachner, 1877), conhecido como piabanha (Figura 1) é uma espécie de peixe nativa e endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul cuja extensão compreende os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (HILSDORF; PETRERE JÚNIOR, 2002) (Figura 2). O gênero *Brycon* pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae, e compreende mais de 70 espécies de peixes com larga distribuição geográfica (FROESE; PAULY, 2010). A piabanha possui abdômen róseo e o dorso prateado, mandíbula projetada para frente e a cabeça achatada, características gerais de peixes predadores (Figura 1). É considerada espécie de grande porte, podendo atingir aproximadamente 8 a 10 kg de peso na natureza (NOMURA, 1984; PEREIRA, 1986; SANTOS, 1987).

Quanto ao hábito alimentar, a piabanha é ictiófaga e insetívora quando jovem e herbívora e frugívora quando adulta. Durante a larvicultura da piabanha é comum verificar-se canibalismo entre indivíduos, o que pode reduzir substancialmente o número de alevinos produzidos. Para se minimizarem as

perdas, normalmente são usadas larvas de outras espécies de peixe, como o curimatá, que servem como alimento para as piabanhas (SHIMODA, 2004).

O período reprodutivo da piabanha, no município de Paraibuna (SP), estende-se de dezembro a fevereiro. Os machos estão aptos à reprodução a partir do segundo ano de vida, quando alcançam cerca de 20 cm de comprimento total, e as fêmeas a partir do terceiro ano de vida, quando, em geral, atingem 25,0 cm de comprimento total (GIRARDI; FARIA; SANTOS, 1993).

A fecundação é externa e as desovas ocorrem quando o nível das águas está em ascensão, durante as chuvas de verão. A desova e o desenvolvimento dos embriões ocorrem nas áreas inundadas ou remansos, nestes locais os alevinos encontram alimento e refúgio para o seu desenvolvimento (SALGADO et al., 1997).

Na década de 50, *B. insignis* foi considerado a quarta espécie mais capturada pela pesca comercial na bacia do Rio Paraíba do Sul, possuindo importante papel para economia regional (MACHADO; ABREU, 1952).

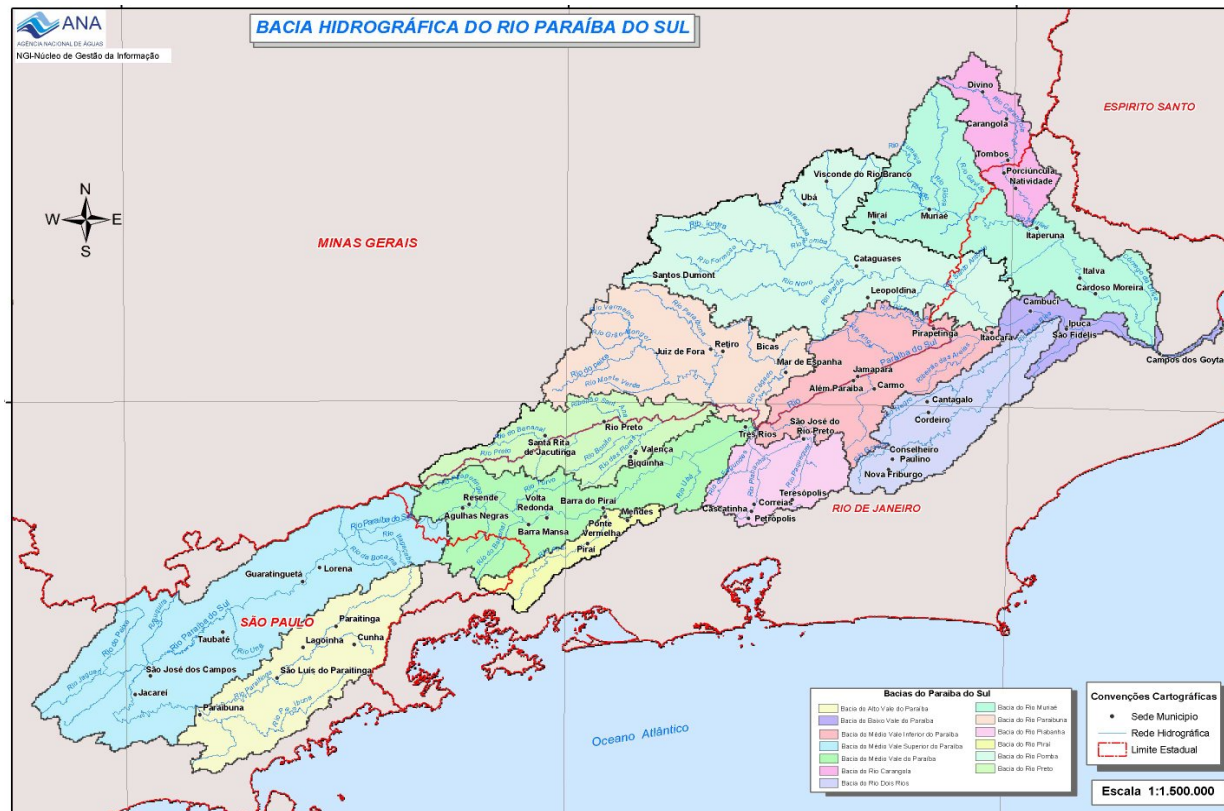


Figura 2 Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul
 Fonte: Comitê das Bacias Hidrográficas do Rio Paraíba do Sul (2011)

Atualmente, a sobrevivência dessa espécie encontra-se bastante ameaçada devido ao grande número de barragens hidrelétricas, que impedem sua migração reprodutiva, pela poluição do rio Paraíba do Sul decorrente do lançamento de esgoto doméstico, industrial e agropecuário, como também pela introdução do dourado (*Salminus brasiliensis*), um voraz predador (SHIMODA, 2004).

No que se refere a sua utilização, a piabanha é muito apreciada pela resistência a captura com anzol na pesca esportiva. A exploração para fins comerciais é ainda praticamente inexistente, tendo a criação de piabanha em estações de piscicultura apenas fins conservacionistas.

2.2 Criopreservação de sêmen

Desde o primeiro estudo bem sucedido de criopreservação de sêmen de peixe (BLAXTER, 1953), vários pesquisadores se dedicaram a estudar e aprimorar essa técnica, inclusive no Brasil. Foram estabelecidos vários protocolos de criopreservação de sêmen, experimentalmente aprovados e uma melhoria considerável tem sido alcançada em tecnologia de criopreservação de sêmen de peixes. A criopreservação do sêmen é um processo que envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido a -196°C , mantendo sua viabilidade por tempo indefinido. Em temperaturas em torno de 5°C , a água intra e extracelular permanece superresfriada e não cristaliza. Entre -5°C a -10°C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular (cristalização). Entretanto o conteúdo celular permanece líquido e superresfriado; ocorre então troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular.

A evolução deste processo depende da velocidade de congelamento. Uma exposição prolongada (congelamento muito lento) das células ainda não congeladas a um meio cada vez mais hiperosmótico causará uma desidratação severa levando a desnaturação das macromoléculas internas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana. Esses eventos são conhecidos como “efeitos de solução” porque ocorrem em consequência da osmolaridade do meio aquoso. Em contrapartida, se o processo de congelamento ocorre muito rapidamente, as células não são capazes de perder água para o meio externo e manter o equilíbrio. O meio interno torna-se supergelado e ocorre a formação cristais de gelo intracelular. Durante o descongelamento, esses cristais podem se recrystalizar em cristais maiores e destruir as membranas celulares internas e externas. Os danos causados pelo processo de criopreservação podem levar a consequências adicionais que incluem deformação estrutural das organelas celulares, anormalidades na estrutura da cromatina espermática e alterações no genoma (BILLARD, 1983). Não há como impedir completamente a ocorrência de tais processos tampouco os danos causados tanto pelos efeitos de solução quanto pela cristalização durante o congelamento.

Apesar disso, a aplicação de tecnologias de criopreservação é essencial quando se busca a formação de bancos de sêmen para conservação de recursos genéticos e recuperação de estoques de espécies ameaçados de extinção. Outras vantagens da criopreservação de sêmen são:

- a) Permitir a troca de sêmen entre os laboratórios de reprodução, observando a variabilidade genética e perfil populacional, para fins de produção e/ou conservação da espécie;
- b) Reduzir o número de reprodutores, diminuindo assim os custos de produção e;

- c) Eliminar problemas de assincronia da maturidade gonadal, entre reprodutores, principalmente os de espécies migratórias, quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente;
- d) Estabelecimento de programas de melhoramento genético e hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes;
- e) Entre outras.

Um protocolo de criopreservação ideal visa:

- a) Obter um meio de congelamento, capaz de prevenir crioinjúrias aos espermatozóides e também à iniciação da motilidade;
- b) A uma velocidade de congelamento e descongelamento ótima - suficientemente lenta para prevenir a formação de gelo intracelular, e rápida pra minimizar o tempo de contato em que as células ficarão expostas aos efeitos de solução.

Em busca deste objetivo diversos protocolos de criopreservação de sêmen têm sido testados. O uso de botijões portáteis de vapor de nitrogênio, conhecidos com *dry-shipper* ou botijão canadense, proporcionou uma grande expansão no desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen de peixes no Brasil. O sêmen de várias espécies de peixes neotropicais da ordem Characiformes tem sido congelado com sucesso utilizando-se desse método, incluindo várias espécies do gênero *Brycon* (Tabelas 1 e 2), entre outros teleósteos (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

Tabela 1 Tipos de container, métodos de congelamento e de descongelamento em banho-maria utilizados na criopreservação de sêmen de espécies de peixes do gênero *Brycon*

Espécie	Palhetas	Congelamento	Descongelamento	Referencias
<i>B. amazonicus</i>	0,5 mL	1 cm acima da superfície do N ₂ L	36°C por 10 seg	Ninhaus et al. (2006a)
<i>B. cephalus</i>	0,5 ou 4,0 mL	1 cm acima da superfície do N ₂ L	36°C por 10-30 seg	Ninhaus et al. (2006b)
<i>B. insignis</i>	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 7 seg	Shimoda (2004)
	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 16 seg ou 60°C por 8 seg	Viveiros et al. (2010a)
<i>B. nattereri</i>	0,25 ou 0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	50°C ou 60°C por 8 seg	Oliveira et al. (2007)
	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 16 seg ou 60°C por 8 seg	Viveiros et al. (2010b)
<i>B. opalinus</i>	4,0 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 32 seg ou 60°C por 24 seg	Viveiros et al. (2010b)
	0,5 ou 4,0 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 16 seg ou 60°C por 8 seg	Orfão (2009)
<i>B. orbignyanus</i>	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	50°C por 10 seg	Murgas et al. (2003)
	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	60°C por 8 seg	Maria et al. (2006a, b)
	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	60°C por 8 seg	Viveiros et al. (2007)
<i>B. orthotaenia</i>	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	35°C por 7-10 seg	Melo e Godinho (2006)

N₂L = nitrogênio líquido

Fonte: Adaptado de Viveiros e Godinho (2009)

Tabela 2 Diluidores, crioprotetores e taxas de diluição utilizados na criopreservação de sêmen de peixes do gênero *Brycon*, que produziram melhores resultados em cada estudo

Espécie	Diluidor	Crioprotetor	sêmen: diluidor	Referências
<i>B. amazonicus</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:4	Ninhaus et al. (2006a)
<i>B. cephalus</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:4	Ninhaus et al. (2006b)
<i>B. insignis</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:6	Shimoda (2004)
	NaCl 1,2%, Glicose, BTS [®] , MIII [®]	Metilglicol	1:10	Viveiros et al. (2010a)
<i>B. nattereri</i>	BTS [®] ou NaCl 0,9%	Metilglicol	1:10	Oliveira et al. (2007) e Viveiros et al. (2010b)
<i>B. opalinus</i>	Glicose	Metilglicol	1:10	Orfão (2009)
<i>B. orbignyanus</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	-	Murgas et al. (2003)
	BTS [®]	Metilglicol	1:10	Maria et al. (2006a)
	NaCl 0,9% + gema de ovo	Metilglicol	1:10	Maria et al. (2006b)
<i>B. orthotaenia</i>	Água de coco em pó (ACP [®])	Metilglicol ou DMSO	1:10	Viveiros et al. (2007)
	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:6	Melo e Godinho (2006)

BTS[®] (Beltsville Thawing Solution, Minitub[®]): sulfato de gentamicina, glicose, citrato de sódio, EDTA, NaHCO₃, KCl.

MIII[®] (Merck III, Minitub[®]): sulfato de gentamicina, glicose, citrato de sódio, EDTA, NaHCO₃.

DMSO = dimetil-sulfóxido

- = não descrito

Fonte: Adaptado de Viveiros e Godinho (2009)

Vários meios de congelamento foram recentemente testados em *Brycon insignis*. O primeiro relato encontrado de criopreservação de sêmen de piabanha foi utilizando um meio de congelamento constituído por glicose e dois crioprotetores dimetil-sulfóxido (DMSO) (interno) e gema de ovo (externo), em diferentes taxas de diluição sêmen:meio envasados em palhetas de 0,5 mL e congelados em *dry-shipper* (SHIMODA, 2004) (Tabelas 1 e 2). Posteriormente, outros meios de congelamento foram testados associando diluidores simples (NaCl e Glicose) e complexos (BTS[®] e M III[®] - Minitub do Brasil) com crioprotetores internos (DMSO e metilglicol) utilizados na diluição do sêmen na proporção 1:10 (sêmen:meio), envasados em palhetas de 0,5 mL e congelados em *dry-shipper*. Como protocolo diferentes temperaturas e período de descongelamento em banho-maria (30°C/16s e 60°C/ 8s) também foram testadas neste trabalho (VIVEIROS et al., 2010) (Tabelas 1 e 2).

Após o descongelamento, na maioria das vezes, a qualidade do sêmen é avaliada em função da percentagem de células móveis observada em microscópio de luz. Este método é subjetivo, mas quando executado por um técnico treinado pode ser bastante preciso, prático e útil para aplicação em pisciculturas. Durante a última década, o uso de um sistema de análise espermática assistida por computador, conhecido como “CASA” (do inglês *computer-assisted sperm analysis*) tem se tornado cada vez mais popular em laboratórios de tecnologia de sêmen europeu e americano (Figura 3). O sistema CASA quantifica os movimentos das células espermáticas usando pelo menos doze características da motilidade calculadas via computador (Figura 4), constituindo um método objetivo de avaliação, de desempenho rápido, fácil e preciso (RURANGWA et al., 2001). O CASA é o mais objetivo método de quantificação da qualidade de sêmen disponível atualmente (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007).



Figura 3 Equipamentos que compõe o sistema CASA (*computer-assisted sperm analysis*) - um microscópio óptico de contraste de fase com câmera acoplada, conectado a um computador com o software instalado. Laboratório de tecnologia de sêmen – DZO/UFLA

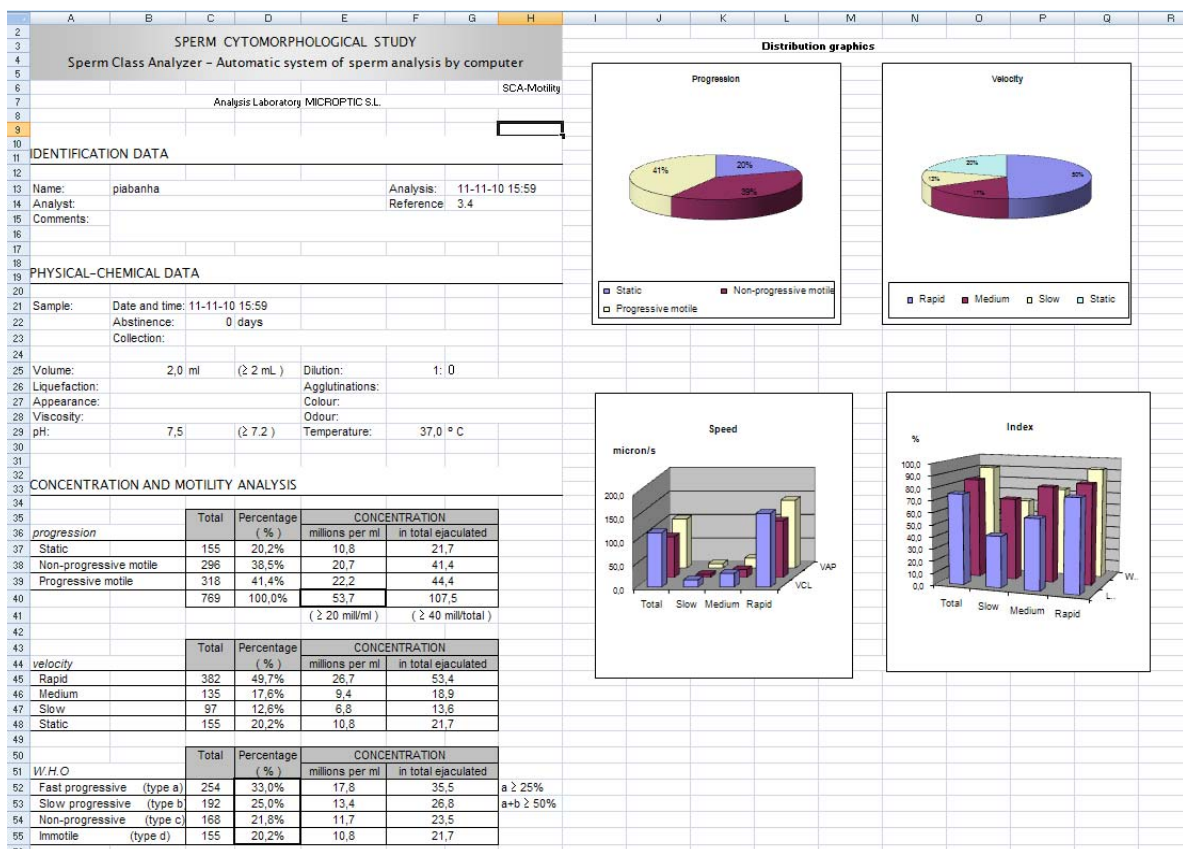


Figura 4 Planilha com o laudo de uma análise espermática emitido via CASA. Laboratório de Tecnologia de Sêmen – DZO/UFLA

2.3 Superfície de ovócitos de peixes da ordem Characiformes

Estudos sobre a biologia de ovócitos de peixes são de grande interesse por fornecerem subsídios para a compreensão da fisiologia dessa célula germinativa, tendo em vista a preservação de gametas, a conservação da ictiofauna e o aprimoramento de técnicas de cultivo (RIZZO; GODINHO, 2003). Ovócitos de peixes apresentam características relacionadas ao comportamento reprodutivo da espécie, podendo ser classificados com relação a sua gravidade, padrão e estrutura de superfície. Em relação à gravidade específica, os ovócitos de peixes podem ser pelágicos ou demersais. Ovócitos pelágicos têm algumas características que permitem sua flutuação e são comuns em espécies marinhas. Ovócitos de peixes de água doce, como os Characiformes, são em sua maioria demersais, isto é, possuem gravidade específica maior do que a da água (RIZZO; GODINHO, 2003).

Quanto à adesividade, os ovócitos de peixes podem ser livres ou apresentar vários graus de adesividade de acordo com a espécie. Ovócitos adesivos aderem entre si formando massas e/ou se ligam a diferentes substratos e ovócitos livres mantêm-se individualizados na água (SATO, 1999). Análises de padrões de comportamento reprodutivo de Characiformes mostram relação entre migração reprodutiva e grau de adesividade do ovócito (Tabela 3) (SATO, 1999). Nos Characiformes, os padrões de superfície têm relação com o grau de adesividade dos ovócitos e em geral, ovos de espécies pertencentes ao mesmo gênero ou família apresentam padrões de superfície similares (Tabela 3) (RIZZO; GODINHO, 2003). Em Characiformes, dois padrões de ovócitos livres têm sido observados: (1) zona radiata lisa com poro-canais simples (Figura 5a) e (2) rede fibrilar recobrando a zona radiata (RIZZO; GODINHO, 2003). A zona radiata lisa constitui o arranjo menos complexo de superfície de ovócitos de peixes de água doce analisados à microscopia eletrônica de varredura (MEV)

(RIZZO et al., 2002). No pólo animal, a densidade dos poros-canaís aumenta em direção à micrópila e seus diâmetros tornam-se variáveis (Figura 5b). No pólo vegetativo do ovócito, os poros-canaís apresentam-se regularmente espaçados e seus diâmetros são similares (RIZZO et al., 2002). A rede fibrilar é uma delicada camada constituída por fibrilas, visualizadas na MEV, sendo pouco densa em torno da micrópila, e mais desenvolvida no pólo vegetativo (RIZZO et al., 2002). Ovócitos adesivos em Characiformes apresentam arranjos especiais na superfície, dependendo do grupo sistemático: zona radiata com poros-canaís hexagonais; filamentos, vilos, ou glóbulos (RIZZO et al., 2002; RIZZO; GODINHO, 2003).

O componente básico da superfície do ovócito, a zona radiata ou zona pelúcida, envolve os ovos de todos os vertebrados e apresenta peculiaridades próprias em cada grupo. Nos peixes teleósteos, a zona radiata tem como características a presença de poros ou canaís, dispostos radialmente na superfície do ovócito, sendo por isso denominada zona radiata (RIZZO; GODINHO, 2003). Esses canaís, que permitem trocas de gases e nutrientes do ovócito com o meio, são formados durante a ovogênese sendo ocupados por prolongamento dos ovócitos e/ou microvilos das células foliculares. Ao final da maturação ovocitária, esses prolongamentos retraem-se e o ovócito separa-se dos envoltórios foliculares deixando os poros-canaís abertos (RIZZO; GODINHO, 2003). A camada interna da zona radiata fica em contato com a membrana ovocitária e é, geralmente, a mais espessada. Ela confere proteção mecânica ao embrião e é constituída de proteínas e glicoproteínas homólogas às macromoléculas da zona radiata de mamíferos (BRIVIO; BASSI; COTELLI, 1991; RIZZO; GODINHO, 2003). A camada externa na superfície do ovo após a desova é, geralmente, fina, de composição química variável entre as espécies e apresenta glicoproteínas neutras ou ácidas que podem estar associadas a mucosubstâncias (RIZZO; GODINHO, 2003).

Tabela 3 Padrão de adesividade dos ovócitos e comportamento reprodutivo em peixes da ordem Characiformes

Adesividade	Características	Exemplos de gêneros
Livres ou pouco adesivos	Comuns em espécies migradoras são pequenos numerosos, grande espaço perivitelino (0,3-1,4 mm) e não estão sujeitos a cuidados parentais. Possuem zona radiata lisa com poros-canais simples ou fina rede fiblilar recobrando a zona radiata.	<i>Astyanax, Brycon, Curimatella, Leporinus, Prochilodus, Salminus, Triportheus</i>
Adesivos	Comuns em espécies não migradoras, são de tamanho variável, menos numerosos, espaço perivitelino geralmente menor (0,2-0,7 mm), e podem estar sujeitos a cuidados parentais. Arranjos especiais de superfície: zona radiata com poros-canais hexagonais, filamentos, vilos ou glóbulos.	<i>Acestrorhynchus, Bryconops, Hoplias, Schizodon, Serrasalmus</i>

Fonte: Rizzo e Godinho (2003) e Rizzo et al. (2002)

No pólo animal, ovócitos de peixes apresentam aparelho micropilar que permite o acesso do espermatozóide fertilizante diretamente à membrana ovocitária, sem ocorrência de reação acrossômica, como ocorre na maioria dos vertebrados (REDDING; PATIÑO, 1993).

A micrópila apresenta forma de funil sendo constituída de vestíbulo e de canal micropilar na maioria dos peixes teleósteos (Figura 5b). O vestíbulo é uma invaginação da zona radiata no qual se aloja o corpo da célula micropilar durante a maturação ovocitária. O canal micropilar contém prolongamento dessa célula e atravessa o restante da zona (RIZZO; GODINHO, 2003).

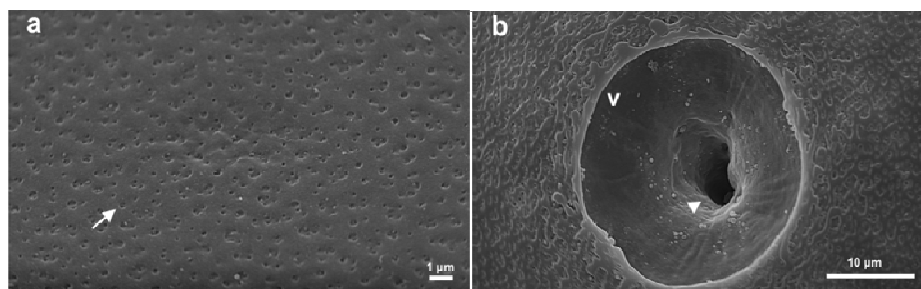


Figura 5 Eletromicrografia de ovócito de *Brycon nattereri*

(a) zona radiata lisa com poros-canais simples (seta); (b) micrópila (v = vestíbulo; cabeça de seta = canal micropilar)

2.4 Fertilização em teleósteos

O processo de fertilização inicia-se quando o espermatozóide entra em contato com a porção externa da zona radiata do ovócito e termina com a fusão dos dois pronúcleos haplóides no citoplasma do ovócito (MOORE, 2001). Em peixes teleósteos, o ovócito apresenta uma abertura estreita na zona radiata, a micrópila, por meio da qual o espermatozóide tem acesso à membrana plasmática do ovócito. Em geral, o espermatozóide que entra na micrópila

primeiramente é destinado a se fundir com a membrana plasmática (HART, 1990). A fertilização promove a ativação do ovócito com a retomada da meiose, interrompida em metáfase II e dispara uma cadeia de eventos no interior do ovócito.

Após a penetração do primeiro espermatozóide, acontece uma série de eventos que constituem o bloqueio a poliespermia e aqueles que seguem o espermatozóide fertilizante permanecem dentro do canal micropilar e são expelidos durante a ativação do ovo (HART, 1990) (Figuras 6 e 7).

Alguns destes eventos incluem:

- a) Ativação da reação cortical com a liberação de lectinas dos grânulos corticais que imobilizam o excesso de espermatozoides no vestíbulo micropilar (IWAMATSU; ISHIJIMA; NAKASHIMA, 1993; IWAMATSU; OHTA, 1978; MURATA, 2003) (Figura 6 b-c; Figura 7);
- b) Formação do cone de fertilização que impede que os espermatozoides adicionais de se unirem à membrana plasmática do ovócito e ou entrem no espaço do perivitelínico (IWAMATSU et al., 1991; KUDO, 1980; MURATA, 2003) (Figura 6d);
- c) Lectinas dos grânulos corticais presentes no fluido perivitelínico interagem através da micrópila com a parte externa da zona radiata para eliminar a orientação espermática e a atração para a micrópila (MURATA, 2003) (Figura 6e-f);
- d) Endurecimento do córion pela alveolina e pela transglutaminase, seguido pela diminuição do diâmetro da micrópila, resultando no fechamento da micrópila para os espermatozoides supranumerários (HART; DONOVAN, 1983; KOBAYASH; YAMAMOTO, 1981; MURATA, 2003) (Figura 6f).

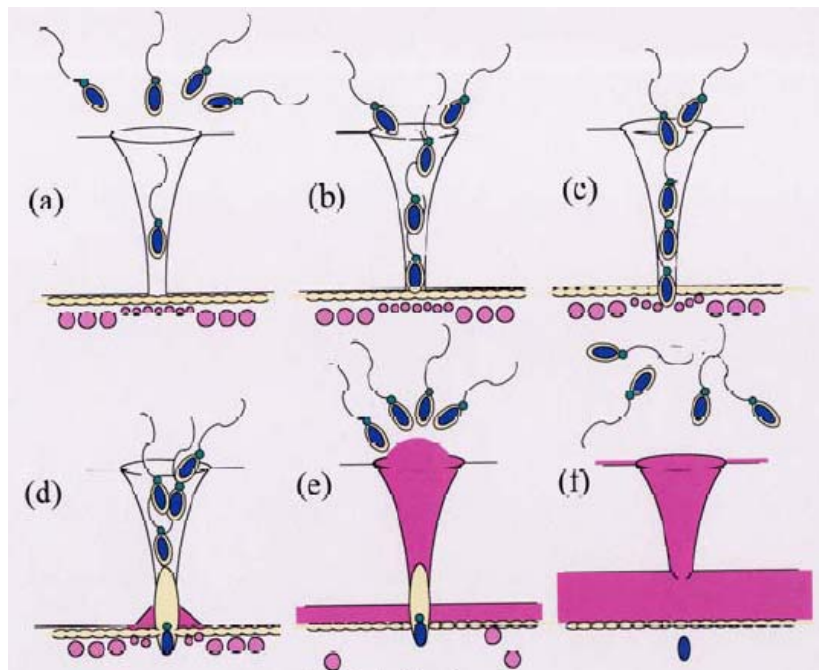


Figura 6 Resumo dos mecanismos de bloqueio a poliespermia em ovos de peixes
Fonte: Murata (2003)

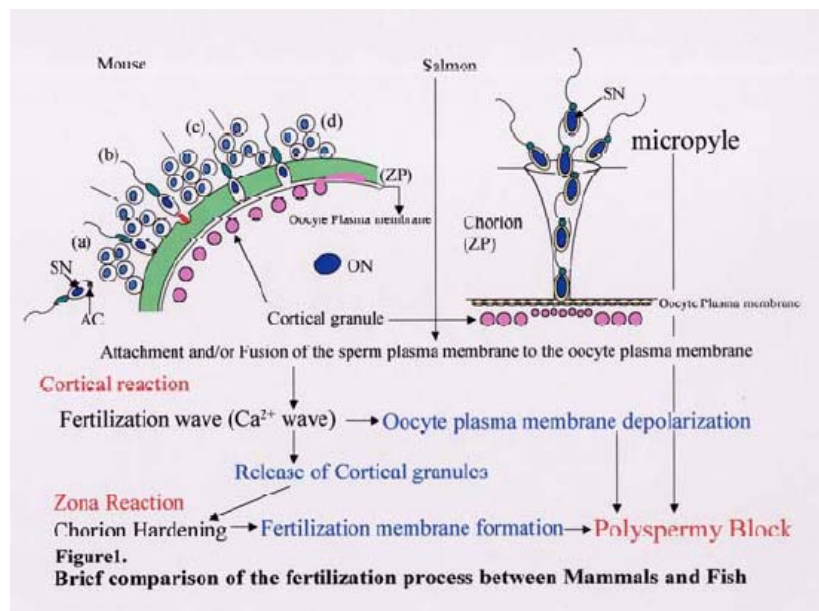


Figura 7 Breve comparação do processo de fertilização entre mamíferos e peixes
Fonte: Murata (2003)

Após a fusão celular, a célula diplóide é submetida a um processo denominado desenvolvimento embrionário ou embriogênese.

2.5 Embriogênese

O desenvolvimento embrionário em peixes é um processo complexo, e seu conhecimento é útil para estudos de ontogenia, como modelo experimental, na avaliação da qualidade ambiental e efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática, assim como para experimentos de preservação da espécie (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Após a fusão dos pronúcleos e os eventos desencadeados pela fertilização, o ovo passa a sofrer alterações que incluem clivagens, movimentação celular e formação dos esboços dos órgãos.

O primeiro estágio observado no desenvolvimento do embrião é conhecido como estágio de zigoto ou blastodisco (Figura 8).



Figura 8 Zigoto

Fonte: Adaptado de Kimmel et al. (1995)

Neste estágio ocorre uma reorganização citoplasmática com a formação dos pólos animal e vegetativo. O pólo animal compreende o citoplasma ativo e o núcleo (blastodisco) do ovo recém formado. O pólo vegetativo é composto pelas vesículas de vitelo envolvidas por fina camada de citoplasma (KIMMEL et al., 1995; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

O estágio de clivagem é caracterizado pelo início das divisões mitóticas (Figura 9). Após a primeira divisão, as células ou blastômeros, dividem-se a cada intervalo de cerca de 15 min. A clivagem dos ovos é do tipo meroblática ou parcial por ocorrer apenas no pólo animal (GANECO 2003; KIMMEL et al., 1995; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). As clivagens se iniciam do centro para as bordas do blastodisco e o número de blastômeros aumenta enquanto seu tamanho diminui (WOURMS; EVANS, 1974). O plano das primeiras clivagens se caracteriza de acordo com a espécie estudada. Entretanto, até 16 blastômeros, a maioria dos teleósteos apresenta 4 fileiras de 4

células cada, formando uma única camada de células (GANECO, 2003; KIMMEL et al., 1995; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).



Figura 9 Clivagem

Fonte: Adaptado de Kimmel et al. (1995)

O estágio de blástula abrange o período em que blastodisco alcança o 8º ciclo de clivagens até o início da gastrulação (KIMMEL et al., 1995) (Figura 10). Os planos de divisão passam a ser indeterminados, espaços irregulares são observados entre os blastômeros através de microscopia, (GANECO, 2003; KIMMEL et al., 1995), os quais podem ser considerados um tipo de blastocele (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). À medida que o número de células aumenta, a blastoderme adquire formato de meia lua. Forma-se a camada sincicial de vitelo, também denominada de periblasto encontrada apenas em teleósteos e posicionando-se de forma extra-embriônica, não contribuindo para a formação do corpo do embrião (KIMMEL et al., 1995).

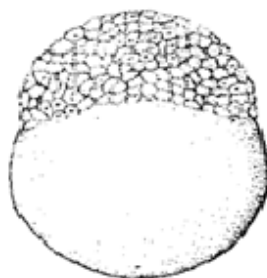


Figura 10 Blástula

Fonte: Adaptado de Kimmel et al. (1995)

O estágio de gástrula é caracterizado pelos movimentos de epibolia, e migração celular que dão origem aos folhetos embrionários e aos eixos embrionários de cabeça-cauda e latero-lateral (KIMMEL et al., 1995; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006) (Figura 11). A epibolia se inicia no final da blástula e ao final da gástrula, o vitelo está completamente coberto pelas células embrionárias. Com 50% de epibolia, iniciam-se os movimentos de migração celular formando duas camadas: superior ou epiblasto e inferior ou hipoblasto (KIMMEL et al., 1995; LAGLER et al., 1977; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). No final da gástrula, o epiblasto dará origem a epiderme, sistema nervoso central, crista neural e placóides sensoriais. O hipoblásto dará origem a um folheto que posteriormente se subdivide em mesoderme e endoderme (KIMMEL et al., 1995). O movimento de epibolia recobre todo o vitelo através da camada sincicial, a qual é delimitada pelo blástoporo, seguindo até ao fechamento total deste (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).



Figura 11 Gástrula - 30, 50 e 90% de epibolia, respectivamente
Fonte: Adaptado de Kimmel et al. (1995)

O estágio de segmentação ou organogênese é caracterizado pela formação de órgãos rudimentares e sistemas a partir do epi e hipoblasto (Figura 12). Assim, somitos se desenvolvem, notocorda, tubo neural e rudimentos de órgãos primários tornam-se visíveis; o broto da cauda torna-se proeminente, levando ao conseqüente crescimento e alongamento do embrião ao longo do eixo cabeça-cauda (KIMMEL et al., 1995). Neste estágio também se observam a vesícula de Kupfer e o aparecimento da vesícula óptica. Pesquisadores descrevem a vesícula de Kupfer como uma cavidade oblíqua e alongada, a qual é separada do periblasto por uma camada de células do endoderma, que aparece no início da segmentação e desaparece ao final deste estágio, sua função permanece desconhecida (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

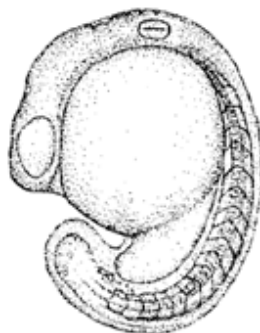


Figura 12 Segmentação

Fonte: Adaptado de Kimmel et al. (1995)

Uma cauda livre, presença de mais de 25 pares de somitos e um embrião em forma larval caracterizam o estágio larval da embriogênese (Figura 13). Os embriões apresentam cálice óptico bem desenvolvido, vesícula óptica e cristalino. A notocorda estende-se da região cefálica a caudal, os somitos iniciam processo de formação de músculos e o intestino primitivo está bem definido. Outra característica deste estágio é a ocorrência de movimentos espasmódicos, que tendem a aumentar à medida que o embrião se desenvolve neste estágio (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

No estágio de eclosão, as larvas recém formadas apresentam movimentos espasmódicos e de natação vigorosos dentro do ovo, importantes para a ruptura do córion (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006) (Figura 13).

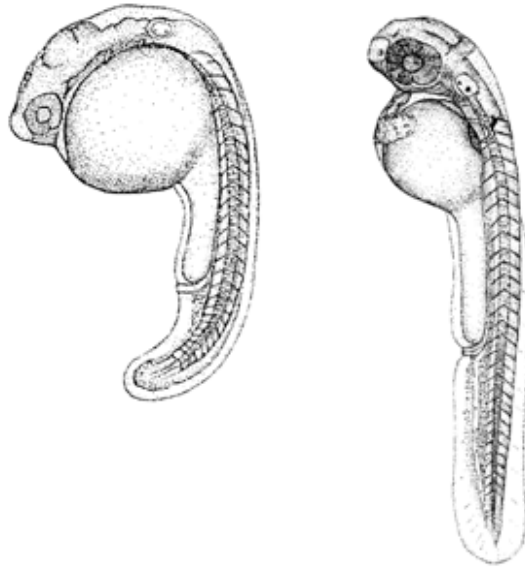


Figura 13 Estágios larval e de eclosão respectivamente
Fonte: Adaptado de Kimmel et al. (1995)

3 OBJETIVO E ESCOPO DA TESE

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar a estrutura dos ovócitos, aprofundar o conhecimento sobre os eventos que envolvem o ovócito recém fecundado, através de estudos de microscopia eletrônica, e os estágios do desenvolvimento embrionário através de estereomicroscópio e, com base neste conhecimento investigar se o uso de sêmen criopreservado na fertilização interferiria no desenvolvimento dos embriões, taxa de eclosão, aparecimento de larvas deformadas e desenvolvimento das progênies de piabanha *Brycon insignis*. O resumo da estrutura desta tese está apresentada na Figura 14.

Em um estudo recentemente aceito para publicação, do qual sou co-autora e que compõe uma dissertação de mestrado, o sêmen desta espécie foi testado diante de alguns meios de ativação, criopreservação espermática e temperaturas de descongelamento (AMARAL, 2009; VIVEIROS et al., 2010). Como conclusão pode-se propor métodos eficientes para criopreservação e avaliação do sêmen para a espécie. O uso de sêmen criopreservado é visto com bons olhos, como uma ferramenta útil no manejo e expansão da aquicultura e como instrumento de preservação genética e conservação das espécies. Contudo, existe o questionamento sobre as conseqüências que os danos sofridos pelos espermatozoides, durante o processo de criopreservação, poderiam provocar ao embrião durante seu desenvolvimento e como seriam a sobrevivência e o desenvolvimento da progênie oriunda da fertilização com sêmen criopreservado.

Assim primeiramente, propôs-se no Artigo 1, estudar os ovócitos, os eventos pós-fertilização e aprofundar os conhecimentos sobre o desenvolvimento embrionário desta espécie.

Utilizando as informações obtidas no Artigo 1 e em nosso estudo anterior de criopreservação, no Artigo 2 procurou-se aprofundar a avaliação do sêmen criopreservado de forma objetiva através do uso de um software de

análise espermática (CASA) e investigar possíveis interferências na embriogênese, formação larval e desenvolvimento de progênies oriundas da fertilização com sêmen criopreservado. Para isso, foi utilizado um dos meios de congelamento e o protocolo de criopreservação para sêmen de *Brycon insignis* proposto anteriormente.

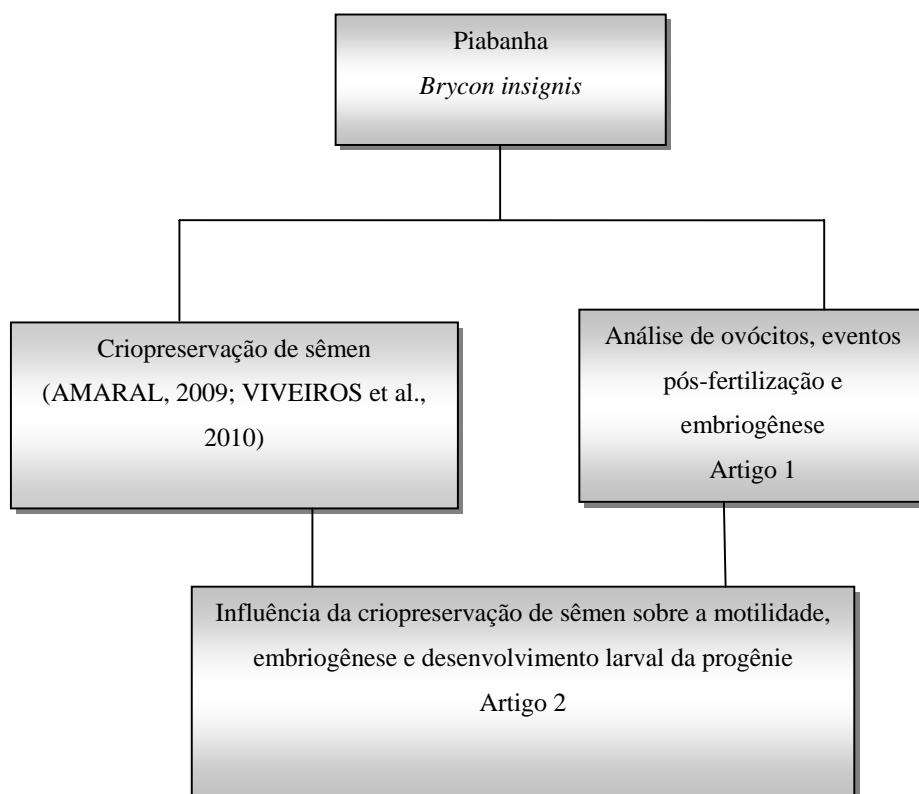


Figura 14 Resumo e estrutura da tese

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, são apresentadas informações sobre as características dos ovócitos de piabanha, os eventos pós-fertilização e desenvolvimento embrionário e efeito do uso de sêmen criopreservado na fertilização.

Estudos sobre biologia de ovócitos e embriogênese de peixes são de grande interesse por fornecerem subsídios tendo em vista a conservação da ictiofauna e o aprimoramento de técnicas de cultivo.

A criopreservação de sêmen é uma técnica que auxilia na reprodução artificial, além de permitir troca de material genético e aumentar a eficiência e variabilidade genética na fertilização possibilitando o uso do mesmo macho com várias fêmeas. No caso de espécies, como a piabanha, que possuem estoques reduzidos na natureza, a possibilidade de formação de banco de sêmen também é bastante interessante. No entanto, como os danos causados pelo processo de criopreservação podem levar a anormalidades na estrutura da cromatina espermática e alterações no genoma, o uso de sêmen criopreservado tem sido visto com cautela. Diversos estudos de criopreservação têm demonstrado que um protocolo de criopreservação eficiente corretamente executado pode fornecer sêmen de boa qualidade.

O protocolo de criopreservação utilizado no presente estudo, já havia sido testado anteriormente. O conhecimento adquirido em relação às características dos estágios embrionários possibilitou uma visão mais crítica na avaliação do desenvolvimento das progênies. Apesar da qualidade espermática pós descongelamento ter sido reduzida em relação à análise feita no momento da coleta, o uso do sêmen criopreservado mostrou-se tão eficaz na fertilização quanto o sêmen recém-coletado. Foi constatado que não houve interferência do uso de sêmen criopreservado, nos estágios de desenvolvimento embrionário avaliados (clivagem e gástrula). As taxas de eclosão, número de larvas normais e

o crescimento das progênies oriundas da fertilização com sêmen fresco ou criopreservado foram semelhantes.

A partir destes resultados, consideramos que o sêmen de piabanha criopreservado em BTS[®] e metilglicol pode ser utilizado na rotina das pisciculturas como instrumento facilitador e de preservação e melhoramento genético. Experimentos utilizando outros meios de congelamento inclusive os propostos por Viveiros et al. (2010), podem ser realizados pra testar sua eficácia na fertilização e desenvolvimento da progênie.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, T. B. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de peixe teleósteo piabanha (*Brycon insignis*)**. 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell and Tissue Research**, Berlim, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, p. 1189-1190, Oct. 1953.
- BRIVIO, M. F.; BASSI, R.; COTELLI, F. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* eggs chorion. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 28, n. 1, p. 85-93, Jan.1991.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M. S. (Ed.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195 p.
- COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO RIO PARAÍBA DO SUL. Taubaté. 2011. Disponível em: <<http://www.comiteps.sp.gov.br/mapas-e-estudos>>. Acesso em: jan. 2010.
- FROESE, R.; PAULY, D. (Ed.). **FishBase**. 2010. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 22 mar. 2010.
- GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida**. 2003. 78 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade de Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GIRARDI, L.; FARIA, C. A.; SANTOS, P. P. Reprodução induzida, larvicultura e alevinagem de piabanha (*Brycon insignis*) na Estação de Aquicultura de Paraibuna CESP/SP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 10., 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s. n.], 1993. p. 92.

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

HART, N. H.; DONOVAN, M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg cortex of *Brachydanio rerio*. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 265, p. 317-328, 1983.

HART, N. H. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. **International Review of Cytology**, New York, v. 121, p. 1-66, 1990.

HAYES, M. C. et al. Performance of juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced from untreated and cryopreserved milt. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, p. 291-302, Sept. 2005.

HILSDORF, A. W. S; PETRERE JÚNIOR, M. Conservação de peixes na bacia do Rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, p. 62-65, jul. 2002.

HORVÁTH, A. et al. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. **Cryobiology**, New York, v. 54, n. 3, p. 251-257, June 2007.

IWAMATSU, T. et al. Time sequence of early events in fertilization in the medaka egg. **Development Growth and Differentiation**, Tokio, v. 33, n. 5, p. 479-490, Oct. 1991.

IWAMATSU, T.; ISHIJIMA, S.; NAKASHIMA, S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 266, n. 1, p. 57-64, May 1993.

IWAMATSU, T.; OHTA, T. Electron microscopic observation on sperm penetration and pronuclear formation in the fish egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 205, n. 2, p. 157-179, Aug. 1978.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, p. 253-310, 1995.

KOBAYASHI, W.; YAMAMOTO, T. S. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 217, n. 2, p. 265-275, Aug. 1981.

KUDO, S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. **Development Growth and Differentiation**, Tokio, v. 22, n. 3, p. 403-414, 1980.

LAGLER, K. F. et al. **Ichthyology**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1977.

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

MACHADO, C. E.; ABREU, H. C. F. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo: I A pesca no vale do Paraíba. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 145-160, 1952.

MISKOLCZI, E. et al. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, p. 119-225, June 2005.

MOORE, K. L. **Embriologia clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 286 p.

MURATA, K. Blocks to polyspermy in fish: a brief review. In: SYMPOSIUM ON AQUACULTURE AND PATHOBIOLOGY OF CRUSTACEAN AND OTHER SPECIES., 32., 2003, Santa Bárbara. **Anais...** Santa Barbara: UJNR, 2003. 1 CD ROM.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme, Prochilodontidae). **Zygote**, Nápoles, v. 14, n. 3, p. 217-229, July 2006.

NOMURA, H. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editerra, 1984. 482 p.

PEREIRA, R. **Peixes de nossa terra**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986. 129 p.

REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC, 1993. p. 591-957.

RIZZO, E. et al. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, London, v. 61, n. 3, p. 615-632, Sept. 2002.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 115-132.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes ameaçados de extinção. In: MACHADO A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2.

RURANGWA, E. et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, n. 3, p. 751-769, Feb. 2001.

SALGADO, A. F. G. et al. **A conservação da piabanha (*Brycon insignis*) na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul**. São Paulo: CESP, 1997. 28 p. (Relatório Técnico).

SANTOS, E. **Peixes de água doce: vida e costumes dos peixes do Brasil**. 4. ed. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 167 p.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do Rio São Francisco: indução e caracterização dos padrões**. 1999. 179 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

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

VIVEIROS, A. T. M et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Hoboken, 28 Dec. 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x/citedby>>. Acesso em: 23 jan. 2010.

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

WILSON-LEEDY J. G.; INGERMANN R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm

motility parameters. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 3, p. 661-672, Feb. 2007.

WOURMS, J. P.; EVANS, D. The annual reproductive cycle of the black prickleback, *Xiphister atropurpureus*, a Pacific Coast blennioid fish. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, v. 52, p. 879-887, July 1974.

YOUNG, W. P. et al. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 289, p. 13-18, Apr. 2009.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 STRUCTURAL ANALYSIS OF OOCYTES, POST-FERTILIZATION EVENTS AND EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE BRAZILIAN ENDANGERED TELEOST *Brycon insignis* (CHARACIFORMES)

Preparado de acordo com as normas e submetido na revista *Zygote*

Summary

ISAÚ, Z.A.; RIZZO, E.; AMARAL, T.B.; MOURAD, N.M.N.; VIVEIROS, A.T.M. Structural analysis of oocytes, post-fertilization events and embryonic development of the Brazilian endangered teleost *Brycon insignis* (Characiformes). In:____. **Análise estrutural dos ovócitos, fertilização e embriogênese e os efeitos da criopreservação do sêmen sobre a motilidade, embriogênese e crescimento larval em piabanha, *Brycon insignis* (Characiformes)**. 2011. 125p, p. 50-88. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

The aim of this study was to evaluate the oocytes, post-fertilization events and embryonic development in *Brycon insignis*, under both scanning electron microscopy and stereomicroscopy. Oocytes and embryos were sampled from spawning until hatching. Stripped oocytes were spherical, non-adhesive, green-brownish, possessed a single micropyle, pore-canals and a mean diameter of 1.46 mm. The fertilization cone formation (20 sec), micropyle closure (100-180 sec) and agglutination of supernumerary spermatozoa (100-180 sec) were the main post-fertilization events. The embryonic development lasted 30 h at ~24°C and it was characterized by seven stages. Zygote, cleavage, blastula and gastrula stages were first observed 0.25, 1, 3 and 6 h post-fertilization, respectively. The fertilization rate was determined at moment of blastopore closure, 10-11 h post-fertilization. The segmentation stage began 11 h post-fertilization and comprised the development of somites, notochord, optic, otic and Kupffer's vesicles, neural tube, primitive intestine, and development and release of the tail. The larval stage began 21 h post-fertilization and was

Comitê orientador: Dr^a Ana Tereza de mndonça Viveiros – UFLA (orientadora); Dr^a Elizete Rizzo – UFMG (co-orientadora)

characterized by the presence of somites, growth and elongation of the larvae. At hatching stage, embryos presented vigorous contraction movements of body and tail and that led to chorion rupture (30 h). The morphological characteristics described for *B. insignis* eggs were similar to those described for other Brycon species, and such knowledge is important for a better understanding of reproductive features of the species in study, and it is useful for ecological and conservational studies.

Keywords: Fertilization, Egg, Embryogenesis, Fish, Characidae

Resumo

ISAÚ, Z.A.; RIZZO, E.; AMARAL, T.B.; MOURAD, N.M.N.; VIVEIROS, A.T.M. Análise estrutural de ovócitos, eventos pós-fertilização e desenvolvimento embrionário da espécie de teleósteo ameaçada *Brycon insignis* (Characiformes). In: ____. **Análise estrutural dos ovócitos, fertilização e embriogênese e os efeitos da criopreservação do sêmen sobre a motilidade, embriogênese e crescimento larval em piabanha, *Brycon insignis* (Characiformes)**. 2011. 125p, p. 50-88. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

Este estudo teve por objetivo avaliar os ovócitos, eventos pós-fertilização e desenvolvimento embrionário em *Brycon insignis*, sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) e estereomicroscópio. Ovócitos e embriões foram coletados a partir de desova até a eclosão. Os ovócitos eram esféricos, não-adesivos, verde-acastanhados, possuíam uma única micrópila, poro-canais e um diâmetro médio de 1,46 mm. Os principais eventos pós-fertilização foram: formação de cone de fertilização (20 seg), aglutinação de espermatozoides supranumerários (100-180 s) e o fechamento da micrópila (100-180 segundos). O desenvolvimento embrionário durou 30 horas, a 24°C e caracterizou-se por sete etapas. Os estágios de zigoto, clivagem blástula e gástrula foram observadas 0,25, 1, 3 e 6 h pós-fertilização, respectivamente. A taxa de fertilização foi determinada no momento do fechamento do blastóporo, 10-11 h pós-fertilização. A etapa de segmentação começou 11 horas após a fertilização e compreendeu o desenvolvimento dos somitos, notocorda, vesículas óptica, ótica e de Kupffer, o tubo neural, intestino primitivo e desenvolvimento da cauda. A fase larval começou 21 horas após a fertilização e se caracterizou pela presença de somitos,

crescimento e alongamento das larvas. Na fase de eclosão, os embriões apresentaram contrações vigorosas da cauda e do corpo levando à ruptura do córion (30 h). As características morfológicas descritas para os ovos de *B. insignis* foram semelhantes aos descritos para outras espécies de *Brycon*. Esse conhecimento é importante para uma melhor compreensão das características reprodutivas da espécie e útil para estudos ecológicos e de conservação.

Palavras-chave: Fertilização, Ovos, Embriogênese, Peixe, Characidae

Introduction

The *Brycon insignis* (Steindachner, 1877), known as tiete tetra in English and piabanha in Portuguese, is a native and endemic species of the Paraíba do Sul River Basin that crosses São Paulo, Minas Gerais and Rio de Janeiro States, in the Southeast region of Brazil (Hilsdorf and Petrere Jr, 2002). The genus *Brycon* belongs to the order Characiformes, family Characidae, subfamily Bryconinae and comprises more than 70 fish species with wide geographic distribution (Froese & Pauly, 2010). As many Brazilian fish species, *B. insignis* migrate to spawn. This migratory behavior is known as *piracema* and lasts from October to February. In the fifties, *B. insignis* was the fourth most captured species in commercial fishing in this basin, therefore displaying an important role in the region's economy (Machado & Abreu, 1952). However, due to over-fishing, pollution and changes in the Paraíba do Sul River course during the construction of the Hydroelectric Paraibuna-Paraitinga, the *B. insignis* reproductive cycle was disrupted and its status is currently set as endangered (Andrade-Talmelli et al., 2001).

Fertilization is a process of cellular fusion encompassing the contact between the spermatozoon and the oocyte up to the union of the nuclei of both cells (Schatten, 1999; Moore, 2001). Fertilization promotes the activation of female gamete with the resumption of meiosis, formerly stuck at metaphase II, and triggers a chain of events inside the oocytes (Brasil et al., 2002). As

fertilization in fish is generally monospermic (Kobayashi & Yamamoto, 1981), after the first spermatozoon penetration, a series of events that prevents polyspermy takes place. These events include mechanical barriers such as: (a) closure of the micropyle (Kobayashi & Yamamoto, 1981; Hart & Donovan, 1983, Kudo et al., 1994), (b) formation of the fertilization cone (Kudo, 1980; Iwamatsu et al., 1991; Linhart & Kudo, 1997; Brasil et al., 2002; Murata, 2003) and (c) activation of the cortical reaction to eliminate any supernumerary spermatozoa (Iwamatsu & Ohta, 1981; Iwamatsu et al., 1993). After cell fusion, one diploid cell undergoes in a process named embryonic development or embryogenesis. The knowledge on embryonic development in fish species is useful to the manage of fishery resources and to undertake surveys related to fish culture since it provides additional information regarding species life cycle, studies on ontogeny, experimental modeling, evaluation of environmental quality and effects of toxic substances on aquatic fauna (Flores et al., 2002), as well as for experiments on ex situ species preservation.

Considering the great number of species, post-fertilization events and embryonic development studies on Neotropical fish species have received little attention. Reports on fertilization events and embryonic development in species belonging to the order Characiformes are available for matrinxã *Brycon cephalus* (Lopes et al., 1995; Romagosa et al., 2001; Alexandre et al., 2010), pirapitinga *Brycon nattereri* (Maria, 2008), piracanjuba *Brycon orbignyanus*

(Ganeco, 2003; Ganeco et al., 2009; Reinalte-Tataje et al., 2004), jatuarana *Brycon* sp (Neumann et al., 2007), aimara *Hoplerythrinus unitaeniatus*, traíra *Hoplias lacerdae* and trahira *Hoplias malabaricus* (Gomes et al., 2007), dorado *Salminus brasiliensis* (Nakaghi et al., 2006) and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Brasil et al., 2002; Ninhaus-Silveira et al., 2006). Preliminary observations of some embryonic (cleavage, gastrula, neurula and embryo) and larval development stages of the *B. insignis* under stereomicroscopy were reported by Andrade-Talmelli et al. (2001). However, oocytes, post-fertilization events, and the zygote and blastula stages of *B. insignis*, have not yet been published. The use of scanning electron microscopy (SEM) to monitor morphological changes in oocytes and eggs allows a detailed observation of the external structures, provides a better understanding of the fertilization and embryonic development of a fish species, and completes the information gathered under histologic and stereomicroscopic analyses.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the oocytes, post-fertilization events and embryonic development in *Brycon insignis*, under both scanning electron microscopy and stereomicroscopy.

Materials and methods

Fish, gamete collection and initial gamete evaluation

All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation (Van Zutphen et al., 1993). *Brycon insignis* broodfish was selected from earthen ponds at the Hydrobiology and Aquaculture Station of Energy Company of São Paulo (CESP) in Paraibuna (23°23'10"S; 45°39'44"W), São Paulo state, Brazil, during the spawning season (January and February, 2009).

Two males of 4-5 years of age (296 ± 28 g) with detectable running sperm under soft abdominal pressure were given a single intramuscular dose of carp pituitary extract (Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at 3 mg/kg body weight and maintained at $\sim 24^\circ\text{C}$. Eight hours later, the urogenital papilla was carefully dried, and sperm was hand-stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (23-25 °C), and soon after collection, the tubes containing sperm were placed in a Styrofoam box containing crushed ice (5 ± 2 °C). Contamination of sperm with water, urine or feces was carefully avoided. An aliquot of 5 μL of each sample was placed on a glass slide and observed under light microscope (Model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at 400x magnification. As fish sperm in seminal plasma should be immotile, any sperm motility was considered to have undergone premature induction resulting from urine or water contamination and the sample was discarded. In samples thusly selected, sperm motility was triggered in 25 μL of 1% NaHCO_3 (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) as activating agent (Viveiros et

al., 2011) and subjectively estimated under light microscope. Sperm concentration (hemacytometer, Neubauer chamber) was also determined.

In order to harvest oocytes, eight females of ~12 years of age (814 ± 297 g) with detectable running oocytes under soft abdominal pressure, received two doses of carp pituitary extract (0.5 and 4.5 mg/kg body weight) at 12 h interval. Along with the second dose, females received a dose of human chorionic gonadotropin (Pregnyl™ Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA) at 1,500 IU hCG/kg body weight and were hand-stripped 8 h later, at ~24°C. The spawning weight, spawning index (spawning weight x 100/body weight), number of oocytes/g ova and the number of oocytes/female were calculated. Three aliquots of oocytes from each female were collected. The first aliquot (n = ~30 oocytes x 8 females) was fixed in Gilson's solution (50 mL 60% ethanol, 440 mL distilled water, 7 mL nitric acid, 10 g mercuric chloride, 9 mL glacial acetic) and the diameter of each oocyte was measured under light microscope using a micrometric objective. The second aliquot (n = ~30 oocytes x 8 females) was fixed in Serra's solution (60 mL 90% ethanol, 30 mL 37% formaldehyde, 10 mL glacial acetic) and the germinal vesicle position (central, peripheric and breakdown) was examined under stereomicroscope (TIM 2T, Opton). Finally, the third aliquot (n = ~20 oocytes x 8 females) was fixed in modified Karnovsky (2.5% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde in 50 mM sodium cacodylate buffer, pH 7.2, 1 mM CaCl₂) and transported to the Laboratory of Electron

Microscopy and Ultrastructural Analysis at the Federal University of Lavras (UFLA), in Lavras, Minas Gerais State, Brazil. Then oocytes were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 4 h at room temperature, washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), dehydrated through grade acetone solutions (25, 50, 75, 90 and 100%), dried with CO₂ in a PELCO CPD 030 critical point, coated with gold under vacuum conditions with SEM Coating Unit SCD 050 and examined with a scanning electron microscope (LEO EVO 40 XVP ESC Carl Zeiss, Santo Amaro, SP, Brazil) equipped with a digital camera.

Fertilization process

Freshly collected sperm was used to fertilize oocytes in a factorial of 2 males x 2 females, performing a total of four progenies. An approximate ratio of $5.0 \pm 1 \times 10^5$ spermatozoa : oocyte was used, based on our previous study with another species of the genus *Brycon* (Maria et al., 2006). To achieve that ratio, 5 g of oocytes (~2835 oocytes) was fertilized with 60 µL of sperm. Fertilization was initiated by the addition of 10 mL tank water and agitated for 1 min. Subsequently, 20 mL tank water was added and samples mixed for another 2 min. Finally, eggs were transferred to four funnel type incubation units (1 progeny = 1 incubation unit) made with 1.5 L plastic bottles with 10 cm of diameter, and incubated in a flow-through system at ~24°C.

Post-fertilization events

Approximately 20 eggs from each incubation unit were collected at 0 (when sperm was mixed with oocyte but before the addition of water), 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 sec post-fertilization. Eggs were fixed in Karnovsky modified and then examined under SEM as described for oocytes. The spermatozoa arrival at the micropyle and the following post-fertilization events were tracked: fertilization cone formation with the expulsion of supernumerary spermatozoa, agglutination of supernumerary spermatozoa in the vestibule, and the beginning of the micropyle closure.

Embryonic development

Approximately 20 eggs from each incubation unit with apparent normal development were collected at 0.25, 0.5, 1 and 1.5 h, every 1.5 h until 6 h and every 5 h until hatching. Eggs were fixed in 2.5% glutaraldehyde, transported to the Laboratory of Semen Technology at UFLA, examined under stereomicroscopy and photographed with digital camera (DSC-W35, Sony Electronic Inc, New York, NY, USA). The following main stages of embryonic development were tracked: zygote, cleavage, blastula, gastrula (blastopore closure), segmentation, larval and hatching (Ninhaus-Silveira et al., 2006).

When most of the developing embryos were observed at the blastopore closure stage, 100-200 eggs were randomly collected from each incubation unit

and the number of fertilized eggs (transparent with a developing embryo), as a percentage of total eggs (transparent + dead or white), was determined. After counting, eggs were placed back into the same incubation unit for further development.

Results

Initial gamete evaluation

B. insignis fresh sperm possessed a mean of $23.5 \pm 1.5 \times 10^9$ spermatozoa/mL and 95% motile sperm upon activation. Recently stripped oocytes were spherical, non adhesive and green-brownish. Spawning weight of 125 g, spawning index of 15.2%, 567 oocytes/g ova, 70,179 oocytes/female and a mean oocyte diameter of 1.46 mm were observed (Table 1). The germinal vesicle position was central in 2% of stripped oocytes, peripheric in 63%, and breakdown in 35%. Under SEM observation, oocyte surface, which corresponds to the chorion or zona radiata, possessed a single micropyle and pore-canals (Fig. 1A). The micropyle was characterized by a conical vestibule and a narrow micropylar canal (Fig 1B). At the animal pole, diameter and number of pore-canals increased towards the micropyle (Fig. 1B and 1C) whereas at the vegetative pole, the pore-canals showed a similar diameter and were uniformly

distributed (Fig. 1D).

Table 1. Female body weight and oocytes characteristics (n = 8 females) of tiete tetra *Brycon insignis* after hormone treatment.

Characteristics	Mean \pm SD	Range
Female body weight (g)	814 \pm 297	400 - 1,200
Spawning weight (g)	125 \pm 52	55 - 178
Spawning index* (%)	15.2 \pm 2.4	12.5 - 19.8
Number of oocytes/g ova	567 \pm 29	530 - 590
Number of oocytes/female	70,179 \pm 27,248	32,175 - 100,890
Oocyte diameter (mm)	1.46 \pm 0.08	1.28 - 1.79

* Spawning index: spawning weight x 100/body weight.

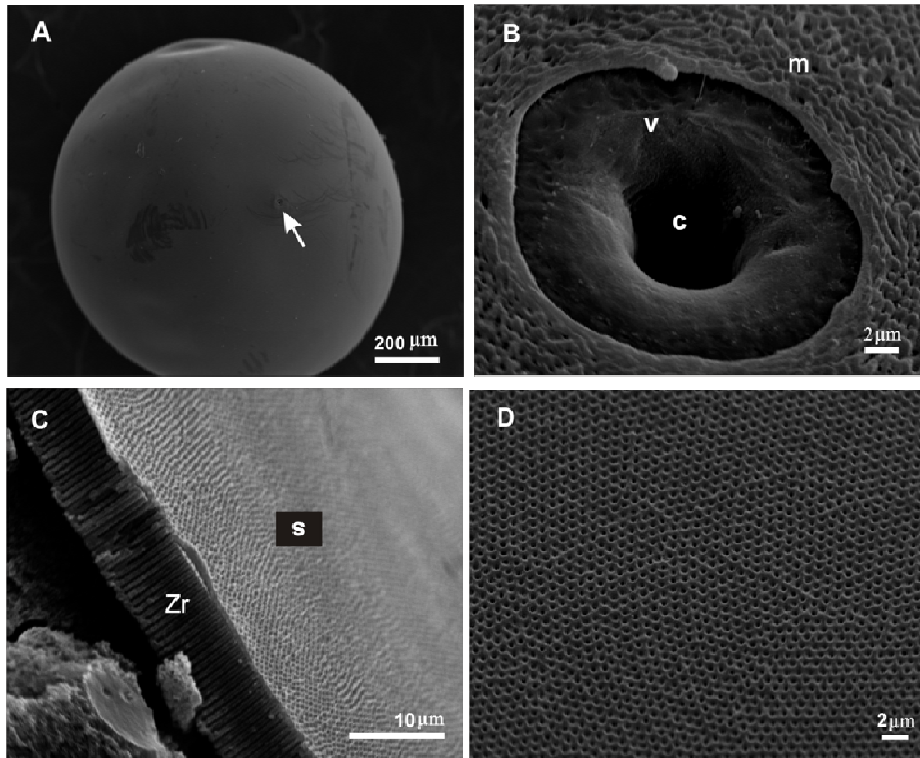


Figure 1. Scanning electron micrographs of the oocyte surface of tiete tetra *Brycon insignis*. (A) single micropyle (arrow) at the oocyte surface; (B) details of micropyle (m) with vestibule (v), micropylar canal (c) and pore-canal at the animal pole; (C) fractured zona radiata with pore-canal at the oocyte surface (s); (D) regular distribution of pore-canal at the vegetative pole.

Post-fertilization events

Some morphological post-fertilization events observed under SEM are depicted in Figure 2A-D and Table 2. Several spermatozoa were observed at the entrance of the micropyle canal when sperm was added to oocytes before the addition of water (time 0; Fig 2A) up to 20 sec post-fertilization. The fertilization cone was characterized as a spherical structure blocking the entrance

of micropyle and was observed 20 to 40 sec post-fertilization (Fig 2B). Agglutinated supernumerary spermatozoa expelled from the micropylar canal (Fig 2C) and the beginning of micropyle closure were observed 100-180 sec post-fertilization (Fig 2D).

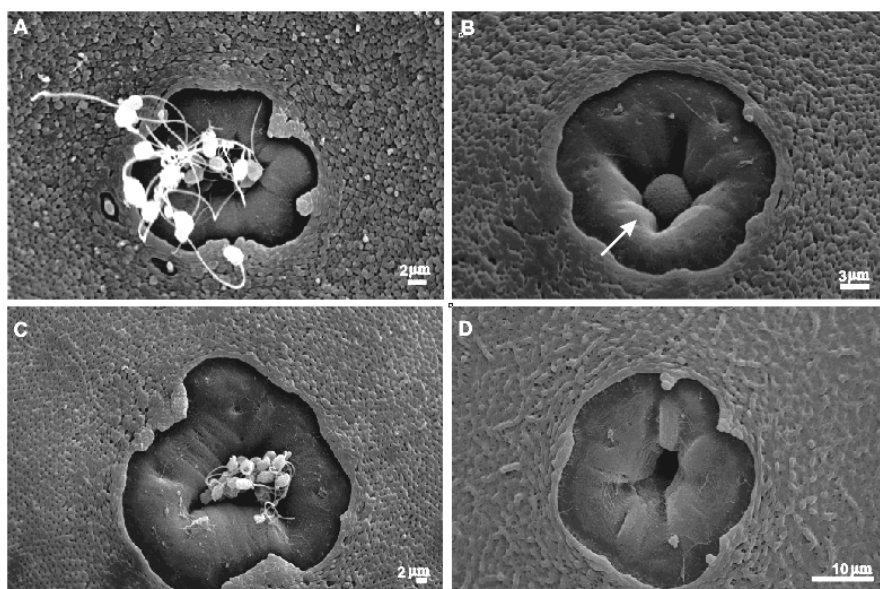


Figure 2. Scanning electron micrographs of some post-fertilization events in tiete tetra *Brycon insignis*. (A) arrival of spermatozoa at micropylar canal, 0-20 sec post-fertilization; (B) fertilization cone (arrow), 20-40 sec post-fertilization; (C) supernumerary spermatozoa expelled from the micropyle, 100-180 sec post-fertilization; (D) reduced micropylar canal diameter 100-180 sec post-fertilization.

Table 2. Seconds post-fertilization when some post-fertilization events were first observed in species of the genus *Brycon*.

Events	<i>B. insignis</i> ^a (~24° C)	<i>B. nattereri</i> ^b (~19° C)	<i>B. orbignyanus</i> ^c (~27° C)	<i>Brycon sp.</i> ^d (~27° C)
Spermatozoa at the micropyle	0 – 20	10 – 20	0 – 90	10 – 30
Fertilization cone	20 – 40	60	60	From 10
Agglutination of supernumerary spermatozoa	100 – 180	60 - 240	ND	80
Beginning micropyle closure	100 – 180	120	ND	ND

ND – not determined.

^aThe present study; ^bMaria, 2008; ^cGaneco et al., 2009; ^dNeumann et al., 2007.

Embryonic development

The embryonic development from fertilization to hatching lasted approximately 30 h at ~24°C (~720 h-degree; Table 3). Under stereomicroscopy analysis, the following embryonic development stages were identified: zygote, cleavage, blastula, gastrula (blastopore closure), segmentation, larval and hatching (Figure 3 and Table 3

Table 3 Hours post-fertilization when the embryonic development stages were first observed in species of the genus *Brycon*.

Stages	<i>B. insignis</i> ^a ~24° C	<i>B. insignis</i> ^b 25-27° C	<i>B. cephalus</i> ^c ~27° C	<i>B. nattereri</i> ^d ~19° C	<i>B. orbignyanus</i> ^e ~27°C
Zygote	0.25	ND	0.25	1.75	0.3
Cleavage	1	0.7	0.5	15	0.5
Blastula	3	2.5	1.25	ND	2
Gastrula	6	4	1.75	21	3
Blastopore closure *	10 – 11	7	6	26	7
Segmentation	11	8.5	7	29	8
Larval	21	10	9	41	11
Hatching	~ 30	14	11	50 – 54	13

ND – not determined

*or 90% of epiboly

^aThe present study; ^bAndrade – Talmelli et al., 2001a; ^cAlexandre et al., 2010; ^dMaria, 2008; ^eGaneco, 2003.

The zygote stage was identified at 0.25 h and lasted up to ~1 h post-fertilization (Fig 3A). This stage were characterized by: (a) the formation of blastodisc on the animal pole comprising the active cytoplasm and nucleus, (b) the formation of vegetative pole composed of yolk and (c) the egg hydration characterized by the increase of the egg diameter from 1.46 to ~4 mm post-fertilization.

The cleavage stage (from 1 to ~3 h; Fig 3B) was characterized by the beginning of cell division into 2, 4, 8, 16, 32 and 64 blastomeres. The cleavage followed meroblastic pattern and blastomeres of distinct sizes were observed. The cleavage pattern was observed as follows: the first cleavage plane was vertical, giving rise to two blastomeres; the second plane was vertical and perpendicular to the first one, giving rise to four blastomeres; the third cleavage was vertical and parallel to the first one, giving rise to eight blastomeres in a 4×2 arrangement; the fourth was vertical and parallel to the second cleavage, giving 16 blastomeres in a 4×4 display; the fifth plane was vertical and parallel to the first cleavage, giving 32 blastomeres in a 4×8 formation; and the sixth cleavage plane was horizontal, giving rise to two cell layers, with a total of 64 blastomeres. Between 1 and 3 h, embryos in different development stages (zygote, cleavage with different number of blastomeres, and blastula) were identified in a given sampling time. From 3 h onwards, embryos developed more uniformly.

During the blastula stage (from ~3 to ~6 h; Fig 3C), blastomeres reorganized and blastoderm possessed a half-moon shape. The blastomeres underwent continuous divisions, but their pattern was undetermined.

The gastrula stage (from ~6 to ~11 h; Fig 3D) was characterized by the migration of blastodisc cells into the vegetative pole through epiboly movement, with gradual cell expansion around the yolk. Two embryonic layers were formed at this stage: the epiblast and hypoblast. Epiboly movement culminated with blastopore closure when the yolk was completely surrounded by the blastoderm forming the yolk sac (Fig 3E). At this moment, fertilization rate of 26% was calculated.

The segmentation stage (from ~11 to ~21 h; Fig. 3F) began with the differentiation of embryonic germ layers. The somites, notochord, neural tube, early delimitation of the intestine and elongation of the embryo (mainly at the head–tail axis) were observed at this stage. Approximately 16 h post-fertilization, the embryos possessed about 18 somites, optic, otic and Kupffer's vesicles at the caudal region and an attached tail.

The larval stage began at ~21 h of the development and was characterized by the presence of a free tail and more than 26 somites. The notochord extended from the cephalic region up to the tail and a well defined primitive posterior intestine could be observed (Fig 3G).

Vigorous muscle contractions of tail and body led to the chorion rupture and to larvae hatching ~30 h post-fertilization. Hatched larvae possessed a transparent and elongated body (Fig. 3H).

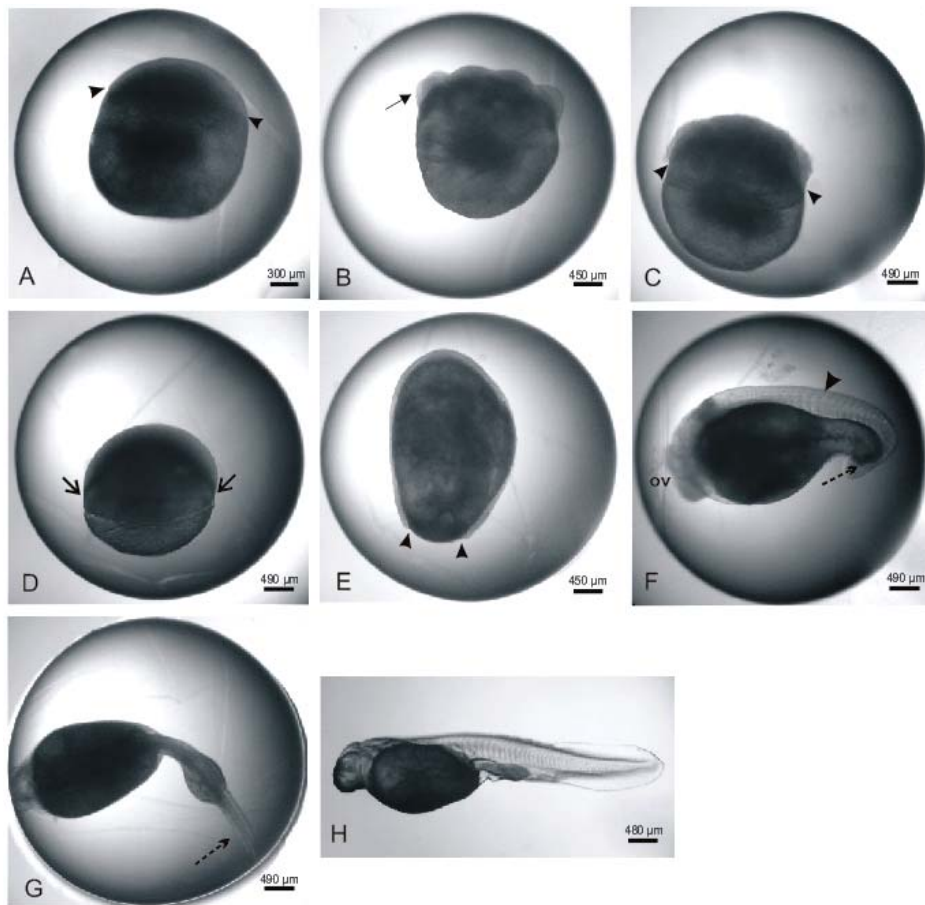


FIGURE 3. Stages of embryogenesis of tiete tetra *Brycon insignis*, observed under stereomicroscopy. (A) zygote with formation of blastodisc (head arrows; 0.25 h post-fertilization); (B) cleavage with some blastomeres (arrow; 1.5 h post-fertilization); (C) blastula (heads arrow; 3 h post-fertilization); (D) beginning of gastrula, 30% epiboly - migration of blastodisc cells (arrows; 6 h post-fertilization); (E) end of gastrula, blastopore closure (heads arrow; 10-11 h post-fertilization); (F) segmentation, optical vesicle (ov), somites (arrow) and attached tail (arrow) (16 h post-fertilization); (G) embryo at larval stage - free tail (arrow; 21 h post-fertilization); (H) recently hatched larvae (~30 h post-fertilization).

Discussion

Stripped oocytes of *Brycon insignis* were spherical, non adhesive, greenish-brown, 1.46 mm of diameter and the germinal vesicle was breakdown in 35% of the oocytes. These characteristics were similar to those reported for other species of the genus *Brycon* (Eckmann, 1984; Vazzoler, 1996; Andrade-Talmelli et al., 2001; Romagosa et al., 2001; Reynalte-Tataje et al., 2004; Ganeco et al., 2009; Alexandre et al., 2010). The oocyte surface of *B. insignis* possessed a single funnel-like shaped micropyle and pore-canals, similarly to other species of Characiformes (Rizzo et al., 2002; Ganeco & Nakaghi, 2003; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Neumann et al., 2007; Maria, 2008; Ganeco et al., 2009; Alexandre et al., 2010). The micropyle is a concave region located at the oocyte surface, composed of a continuous vestibule, with an internal canal that narrows towards the plasmatic membrane of the egg (Ganeco & Nakaghi, 2003). According to previous reports in teleost species, the internal canal opening allows the entrance of a single spermatozoon (Kobayashi & Yamamoto, 1981; Rizzo & Bazzoli, 1993; Ganeco & Nakagui, 2003; Alexandre et al., 2010) as a mechanism to avoid polyspermy.

In the present study, spermatozoa were first observed at the micropyle entrance, immediately after the sperm-oocyte mixture, and before the addition of water (time 0), similar to the characiforms *B. orbignyanus* (Ganeco et al., 2009) and the cypriniforms common carp *Cyprinus carpio* (Kudo, 1980), suggesting an

influence of ovarian fluid as an activating agent of sperm motility. A fast spermatozoa arrival (from 10 to 30 sec) was reported on *B. nattereri* and *Brycon* sp. (Table 2). Soon after the membrane fusion of both gametes, and, the penetration of the fertilizing spermatozoa into the oocyte, the membrane flow occurs in the region of sperm penetration, and progresses toward the micropylar vestibule plugging the inner opening in order to prevent the supernumerary sperm from attaching and/or to penetrating into the space between egg envelope and oocyte plasma membrane forming a structure named fertilization cone (Kudo, 1980; Iwamatsu et al., 1991; Brasil et al., 2002; Murata, 2003). In this study, the fertilization cone was spherical and it was first observed 20 to 40 sec post-fertilization, similarly to other species of genus *Brycon* (Table 2). The beginning of micropyle closure was observed 100 sec post-fertilization, similarly to *B. nattereri* (Table 2). The micropyle shape and these post-fertilization events act as mechanisms to prevent polyspermy intercepting the entry of supernumerary spermatozoa (Iwamatsu et al., 1993; Murata, 2003; Ganeco, 2003; Ganeco et al., 2009).

A relatively short embryonic development period is typical of Neotropical rheophilic fish species, since the water temperature during spawning season is warm (Sato et al., 2003). Incubation temperature influences the duration of development as well as the overall survival rate (Sato et al. 2000; Hansen & Falk-Petersen, 2002). In this study, hatching occurred ~30 h post-

fertilization at a water temperature of ~24°C. In a previous study using the same fish species (Andrade-Talmelli et al., 2001), hatching occurred 14 h post-fertilization at 25-27°C, similar to *B. cephalus* and *B. orbignyanus* (11 to 13 h at ~27°C; Table 3). The *B. insignis* broodfish used in both studies were selected from the same Aquaculture Station at CESP, but 13 years apart. Currently, the incubation period of *B. insignis* eggs carried out by the CESP technicians is similar to that we have observed during our fertilization trial. It is possible that, broodfish and their progenies underwent domestication during all these years and somehow incubation period became longer due to the lower temperature here observed.

It is interesting to point out that the incubation period of *B. nattereri* eggs is very long (50 to 54 h) compared to other species of this genus. However, unlike most of the Neotropical fish species which spawning occurs during the rainy season, *B. nattereri* spawns after the rainy season until the end of the dry season (Lima et al. 2007). Thus, water temperature is frequently below 20°C and this delays embryonic development.

The embryonic development events observed in *B. insignis* are in accordance with previous observations described by Andrade-Talmelli et al. (2001) and were similar to those reported for other species of Characiformes (Lopes et al., 1995; Romagosa et al., 2001; Reynalte-Tataje et al., 2004; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Gomes et al., 2007; Maria, 2008; Ganeco et al.,

2009; Alexandre et al., 2010), as well as Siluriformes (Godinho et al., 1978; Cardoso et al., 1995; Faustino et al., 2007; Marques et al., 2008; Amorim et al., 2009; Perini et al. 2010;). During the first 3 h, *B. insignis* embryos in different stages (zygote, cleavage and blastula stage) in a given sampling time were identified. It has been reported that the variations in the velocity of embryonic development are related to the breeders' age and the temperature of incubation (Morrison et al., 2001). However, even within spawns fertilized and incubated under the same conditions, asynchrony of embryonic development has been observed in characiforms such as *B. cephalus* (Alexandre et al., 2010), *B. nattereri* (Maria, 2008) and *P. lineatus* (Ninhaus-Silveira et al., 2006) as well as in perciforms such as the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Morrison et al., 2001). From 3 h post-fertilization onwards, embryos developed more uniformly within each stage.

The pattern of egg cleavage in vertebrates depends on the amount and distribution of yolk and its proportion in relation to the cytoplasm that composes the zygote (Gilbert, 1991). *B. insignis* eggs can be classified as macrolecithal (because of the large amount of yolk) or telolecithal (because yolk is concentrated at the vegetative pole) (Devlin & Nagahama, 2002). The cleavage of *B. insignis* followed a meroblastic or partial pattern, restricted to the animal pole as commonly observed in teleosts (Lagler et al., 1977; Leme dos Santos & Azoubel, 1996; Ninhaus-Silveira et al., 2006). During the cleavage stage, the

number of cells increased while their size decreased, as previously reported in teleost embryos (Castellane et al., 1994; Ganeco, 2003; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Maria, 2008; Alexandre et al., 2010).

At the blastula stage, the blastoderm presented a half-moon shape and irregular spaces between the blastomeres (blastocoele) with the formation of two main regions (external cells of the blastodisc and the beginning of yolk syncytial layer) being observed. At the gastrula stage, epiboly movements begins, at which the blastoderm cells extended to cover the whole surface of the egg up to the blastopore closure. Subsequently the tail button starts forming. This event indicates that fertilization was successful (Perini et al., 2010). The differentiation of embryonic germ layers and elongation of the embryo at the head–tail axis were developed during the segmentation stage. The release of the tail and the formation of more than 26 somites characterized the beginning at larval stage. During this stage, muscle contractions were observed. At hatching, muscle contractions are intensifies which movements culminate with the chorion rupture. The blastula, gastrula, segmentation, larval and hatching stages were similar to the description of the embryonic development not only of other characiforms (Castellane et al., 1994; Andrade-Talmelli et al., 2001; Ganeco, 2003; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Maria, 2008; Alexandre et al., 2010), but also of siluriforms (Marques et al., 2008; Perini et al., 2010) and cypriniforms (Kimmel & Law, 1985; Trinkaus, 1984).

In conclusion, the morphology of oocyte, post-fertilization events and embryonic development stages here observed add new data on the reproductive biology and initial development of *B. insignis* under captive conditions. Such knowledge is important for a better understanding of reproductive features of a species, helpful to elucidate issues related to fish rearing, useful to further taxonomic, ecological and conservational studies in the *B. insignis*.

Acknowledgements

This research was supported by FAPEMIG (projects: CVZ 1609-06; APQ 2578-5-04-07; CAEG APQ 02715-02), CNPq (grants: 556495/2008-0; 141748/2008-7) and CESP/ANEEL (project: 0061-017/2006). The authors warmly thank D. Caneppele, L.H.C. Oliveira and other technicians of the Hydrobiology and Aquaculture Station of CESP, Paraibuna/SP for assistance with experiments.

References

- Alexandre, J.S., Ninhaus-Silveira, A., Veríssimo-Silveira, R., Buzollo, H., Senhorini, J.A. & Chaguri, M.P. (2010). Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Zygote* **18**, 173-183.

- Amorim, M.P., Gomes, B.V.C., Martins, Y.S., Sato, Y., Rizzo, E. & Bazzoli, N. (2009). Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquac. Res.* **40**, 172-180.
- Andrade-Talmelli, E.F., Kavamoto, E.T., Romagosa, E. & Fenerich-Verani, N. (2001). Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca* **27**(1), 21–28.
- Brasil, D.F., Nakaghi, L.S.O., Santos, H.S.L., Grassiotto, I.Q. & Foresti, F. (2002). Estudo morfológico dos primeiros momentos da fertilização em curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). *CIVA 2002*, **1** pp. 733–747. Disponível em <http://www.civa2002.org/>
- Cardoso, E.L., Alves, M.S.D., Ferreira, R.M.A. & Godinho, H.P. (1995). Embryogenesis of the neotropical freshwater siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquat. Living Resour.* **8**, 343–346.
- Castellani, L.R., Tse, H.G., Leme dos Santos, H.S. & Faria, R.H.S. (1994). Desenvolvimento embrionário do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). *Rev. Bras. Ciênc. Morfol.* **11**, 99–105.

- Devlin, R.H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191-364.
- Eckmann, R. (1984). Induced reproduction in *Brycon cf. erythropterus*. *Aquaculture* **38**, 379–382.
- Faustino, F., Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Makino, L.C. & Senhorini, J.A. (2007). Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos surubins (pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* × cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Acta Sci.* **29**, 49–55.
- Flores, J.C.B., Araiza, M.A.F. & Valle, M.R.G. (2002). Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon idellus* (Carpa herbívora). *CIVA 2002* **1**, pp. 792–797. Disponível em: <http://www.civa2002.org/>
- Froese, R., Pauly, D. Editors. (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication (<http://www.fishbase.org>), version (03/2010).
- Ganeco, L.N. (2003). *Análise dos ovos de piracanjuba, Brycon orbignyianus (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida*. MSc Thesis, Universidade de Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil.

- Ganeco, L.N. & Nakaghi, L.S.O. (2003). Morfologia da superfície dos ovócitos e caracterização da micrópila de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, sob microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci.* **25**, 227–231.
- Ganeco, L.N., Franceschini-Vicentini, I.B. & Nakaghi, L.S.O. (2009). Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. *Zygote* **17**, 93–99.
- Gilbert, S.F. (1991). *Developmental Biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Godinho, H.M., Fenerich, N. De A. & Narahara, M.Y. (1978). Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hylarri* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Rev. Bras. Biol.* **38**, 151-156.
- Gomes, B.V.C., Scarpelli, R.S., Arantes, F.P., Sato, Y., Bazzoli, N. & Rizzo, E. (2007). Comparative oocytes morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. *J. Fish Biol.* **70**, 1412-1429.
- Hansen, T.K. & Falk-Petersen I.B. (2002). Growth and survival of first-feeding spotted wolf fish (*Anarhichas minor Olafsen*) at various temperature regimes. *Aquac. Res.* **33**, 1119-1127.
- Hart, N.H. & Donovan, M. (1983). Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *J. Exp. Zool.* **227**, 277-296.

Hilsdorf, A.W.S. & Petreire Jr, M. (2002). Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* **30**, 62-65.

Iwamatsu, T. & Ohta, T. (1981). Scanning electron microscopic observation on sperm penetration in teleostean fish. *J. Exp. Zool.* **218**, 261-277.

Iwamatsu, T., Onitake, K., Yoshimoto, Y. & Hiramoto, Y. (1991). Time sequence of early events in fertilization in the medaka egg. *Dev. Growth Differ.* **33**, 479-490.

Iwamatsu, T., Ishijima S. & Nakashima, S. (1993). Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. *J. Exp. Zool.* **266**, 57-64.

Kimmel, C.B. & Law, R.D. (1985). Cell lineage of zebrafish blastomeres: II Formation of the yolk syncytial layer. *Dev. Biol.* **108**, 86-93.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R. & Ullmann, B. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253-310.

Kobayashi, W. & Yamamoto, T. (1981). Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J. Exp. Zool.* **217**, 265-275.

- Kudo, S. (1980). Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Dev. Growth Differ.* **22**, 403-414.
- Kudo, S., Linhart, O. & Billard, R. (1994). Ultrastructural studies of sperm penetration in the egg of the European catfish, *Silurus glanis*. *Aquat. Living Resour.* **7**, 93-98.
- Lagler, K.F., Bardach, J.E., Miller, R.R. & Passino, D.R.M. (1977). *Ichthyology*, 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Leme dos Santos, H.S. & Azoubel, R. (1996). *Embriologia comparada*. Jaboticabal: FUNEP.
- Lima F.C.T., Albrecht M.P., Pavanelli C.S. & Vono V. (2007). Threatened fishes of the world: *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characidae). *Environ. Biol. Fishes* **1**, 1-2.
- Linhart, O. & Kudo, S. (1997). Surface ultrastructure of paddlefish egg before and after fertilization. *J. Fish Biol.* **51**, 573-582.
- Lopes, R.N.M., Senhorini, J. A. & Soares, M.C.F. (1995). Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* Gunther, 1869, (PISCES, CHARACIDAE). *Bol. Tec. Cepta* **8**, 25-39.

Machado C.E. & Abreu H.C.F. (1952). Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo – I. A pesca no vale do Paraíba. *Bol. Ind. Animal* **13**, 145-160.

Maria, A.N. (2008). Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864). PhD Thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F. & Oliveira, A.V. (2006). Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* **260**, 298-306.

Marques, C., Nakaghi, L.S.O., Faustino, F., Ganeco, L.N., & Senhorini, J.A. (2008). Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. *Zygote* **17**, 1-10.

Moore, K.L. (2001). *Embriologia Clínica*. 4th edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

- Morrison, C.M., Miyake, T. & Wright Jr., J. (2001). Histological study of the development of the embryo and early larvae of *Oreochromis niloticus* (Pisces; Cichlidae). *J. Morphol.* **247**, 172-195.
- Murata, K. (2003). Blocks to polyspermy in fish: A brief review. In: *Symposium on aquaculture and pathobiology of crustacean and other species*, **32**, 2003, Santa Barbara. Anais...Santa Barbara: UJNR. Aquaculture Panel Proceedings.
- Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Faustino, F., Ganeco, L.N. & Senhorini, J.A. (2006). Desenvolvimento embrionário do dourado (*Salminus brasiliensis*) por meio de microscopia eletrônica de varredura. *Bol. Tec. Cepta* **19**, 9-19.
- Neumann, E., Mendes, J.M.R. & Nakaghi, L.S.O. (2007). Momentos da fertilização induzida em jatuarana *Brycon* sp. (Teleostei, Characidae) em microscopia eletrônica de varredura. In: *Congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce*, **1**, Dourados. Anais... ISSN 1809 9718; 87 Dourados: Painel Proceedings.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F. & Azevedo, A. (2006). Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme, Prochilodontidae). *Zygote* **14**, 217-229,

- Perini, V.R., Sato, Y., Rizzo, E. & Bazzoli, N. (2010). Biology of eggs, embryos and larvae of *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces: Siluriformes). *Zygote* **18**, 159-171.
- Reynalte-Tataje, D., Zaniboni-Filho, E. & Esquivel, J.R. (2004). Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Sci.* **26**, 67–71.
- Rizzo, E. & Bazzoli, N. (1993). Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces Characiformes). *Eur. Arch. Biol.* **104**, 1-6.
- Rizzo, E., Sato, Y., Barreto, B.P. & Godinho, H.P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* **61**, 615-632.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y. & Fenerich-Verani, N. (2001). Stages of embryonic development of the ‘matrinxã’, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca* **27**, 27-32.
- Sato Y., Fenerich-Verani N., Verani J.R., Vieira L.J.S., & Godinho, H.P. (2000). Induced reproductive responses of the neotropical anostomids fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. *Aquac. Res.* **11**, 189-193.

Sato Y., Fenerich-Verani N., & Godinho H.P. (2003). Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho H.P., Godinho A.L. (Org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 257-289.

Schatten, G. (1999). Fertilization. In: *Encyclopedia of Reproduction 2*. London: Academic Press.

Trinkaus, J.P. (1984). Mechanism of *Fundulus* epiboly: a current review. *Am. Zool.* **24**, 673-688.

Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V. & Beynen, A.C. (1993). *Principles of laboratory animal science – A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results*. Elsevier, Amsterdam.

Vazzoler, A.E.A.M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM. 169 pp.

Viveiros, A.T.M., Amaral, T.B., Orfão, L.H., Isau, Z.A., Caneppele, D. & Leal, M.C. (2011). Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agent on motility features. *Aquac. Res.* (Manuscript number: ARE-OA-10-May-377.R1) *accepted*.

Versão preliminar sujeito à alterações pelo conselho editorial da revista.

**ARTIGO 2 DOES SPERM CRYOPRESERVATION INTERFERE ON
MOTILITY, EMBRYOGENESIS AND LARVAL GROWTH
OF NEOTROPICAL FISH TIETE TETRA, *Brycon insignis*?**

Preparado de acordo com as normas da revista Theriogenology

Abstract

ISAÚ, Z.A.; Caneppele, D.; VIVEIROS, A.T.M. Does sperm cryopreservation interfere on motility, embryogenesis and larval growth of neotropical fish tiete tetra, *Brycon insignis*? In: _____. **Análise estrutural dos ovócitos, fertilização e embriogênese e os efeitos da criopreservação do sêmen sobre a motilidade, embriogênese e crescimento larval em piabanha, *Brycon insignis* (Characiformes)**. 2011. 125p, p. 89-123. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

Sperm cryopreservation is an important method to preserve genetic information and to facilitate procedures for artificial reproduction. The aim of this study was to investigate whether the process of cryopreservation interferes with the post-thaw sperm motility, embryogenesis and larvae growth in *Brycon insignis*. Sperm was diluted in methylglycol and BTS™, loaded into 0.5 mL straws, frozen in nitrogen vapor (in a dry shipper), and stored in liquid nitrogen (-196 °C). Half of the samples were evaluated for sperm quality, both subjectively (motility rate and quality motility score) and under computer-assisted sperm analyzer (CASA) system. The other half was used for fertilization. Embryogenesis (cleavage and gastrula stages), hatching rate, percentage of normal larvae and larvae growth up to 112 days post-hatching (dph) were evaluated. Fresh sperm was analyzed similarly (except for CASA) and used as a control. Post-thaw subjective motility and quality motility score significantly decreased from 100% motile sperm and score 5 in fresh sperm to 53% motile sperm and score 3 in cryopreserved. There was no difference between subjective (53%) and CASA (55%) evaluation of post-thaw sperm motility. Embryos and

*Comitê orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (orientadora)

larvae originated from cryopreserved sperm developed similarly to those from fresh sperm. All viable embryos at 1.5 h and 10 h post-fertilization were at the cleavage (56-68%) and gastrula (24%), respectively. Hatching rate was 24% and normal larvae varied of 88 to 97%. Specimens increased from 1.3-1.6 cm (7 dph) to 12-13.8 cm (112 dph) of standard length and from 0.03-0.04 g (7 dph) to 35.4- 45.9 g of body weight (112 dph). Although motility rate and quality motility score were higher in fresh sperm, no difference was observed on embryogenesis, normal larvae and larvae growth between progenies originated from cryopreserved or fresh sperm of *Brycon insignis*.

Keywords: Sperm quality, CASA, Progenies, Teleost, Characidae

Resumo

ISAÚ, Z.A.; Caneppele, D.; VIVEIROS, A.T.M. A criopreservação de sêmen interfere na motilidade, embriogênese e crescimento larval do peixe neotropical piabanha *Brycon insignis*? In: _____. **Análise estrutural dos ovócitos, fertilização e embriogênese e os efeitos da criopreservação do sêmen sobre a motilidade, embriogênese e crescimento larval em piabanha, *Brycon insignis* (Characiformes)**. 2011. 125p, p. 89-123. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.*

A criopreservação de sêmen é um método importante para preservar a informação genética e facilitar os procedimentos de reprodução artificial. Este estudo teve por objetivo investigar se o processo de criopreservação interfere na motilidade espermática pós-descongelamento, embriogênese e o crescimento das larvas em *Brycon insignis*. O sêmen foi diluído em BTS[®] e metilglicol, envasado em palhetas de 0,5 mL, congelado em vapor de nitrogênio (*dry shipper*), e armazenado em nitrogênio líquido (-196 ° C). Metade das amostras foram avaliadas quanto à qualidade do sêmen, tanto subjetivamente (taxa de motilidade e vigor) quanto objetivamente através de software (CASA). A outra metade foi utilizada para a fertilização. Foram avaliados a embriogênese (clivagem e gástrula), taxa de eclosão, a porcentagem de larvas normais e crescimento das larvas até 112 dias pós-eclosão (dpe). Sêmen fresco foi avaliado de forma semelhante (exceto CASA) e usado como controle. Após descongelamento a motilidade subjetiva e o vigor diminuiu significativamente de 100% de espermatozóides móveis e vigor 5 no sêmen fresco para 53% espermatozóides

móveis e escore 3. Não houve diferença entre a avaliação da motilidade subjetiva (53%) ou CASA (55%) pós-descongelamento dos espermatozóides. Embriões e larvas provenientes de espermatozóides criopreservados se desenvolveram de forma semelhante aos do sêmen fresco. Todos os embriões viáveis às 1,5 h e 10 h pós-fertilização estavam na clivagem (56-68%) e gástrula (24%), respectivamente. A taxa de eclosão foi de 24% e o percentual de larvas normais variou de 88 a 97%. Os indivíduos aumentaram de 1,3-1,6 cm (7 dpe) para 12-13,8 cm (112 dpe) de comprimento padrão e 0,03-0,04 g (7 dpe) para 35,4-45,9 g de peso corporal (112 dpe). Embora a taxa de motilidade e o vigor tenham sido maiores no sêmen fresco, não houve diferença no desenvolvimento embrionário, percentual de larvas normais e crescimento dos indivíduos entre as progênes provenientes do sêmen criopreservado e fresco de *Brycon insignis*.

Palavras chave: Qualidade espermática, CASA, Progênes, teleósteo, Characidae

1. Introduction

The genus *Brycon* belongs to the Characiformes order, Characidae family, Bryconinae subfamily and comprises more than 70 fish species with wide geographic distribution [1]. The *Brycon insignis* (Steindachner, 1877), known as tiete tetra in English and piabanha in Portuguese, is a native and endemic species from the Paraíba do Sul River basin [2] that crosses São Paulo, Minas Gerais and Rio de Janeiro States, states of the Southeast region of Brazil.. In the past, *B. insignis* was the fourth most captured species in commercial fishing in this basin, therefore displaying an important role in the region's economy and sportive fishing [3,4]. Many Brazilian fish species, including *B. insignis*, migrate up-stream, in a process known as *piracema*, to spawn. However, the *B. insignis* reproductive cycle was disrupted and its is currently set as an endangered species [5] due to over-fishing, pollution, and changes in the river course caused by the construction of the hydroelectric dam Paraibuna-Paraitinga. The genus *Brycon* is highly affected by these environmental changes, and many species are in the red list of Brazilian threatened fauna, such as tiete tetra *B. insignis*, pirapitinga *B. nattereri*, pirapitinga-do-sul *B. opalinus* and piracanjuba *B. orbignyanus* [6].

One of the methods to preserve genetic information among generations is the use of frozen or cryopreserved sperm. Sperm cryopreservation is an important technique in fish culture, as it facilitates procedures for artificial

reproduction. Cryopreserved sperm may be kept in germplasm banks for an indefinite period and serves as a genetic bank, that may help ensure genetic diversity. In addition, cryopreservation allows reproductive success for population management strategies with cost reduction in stock maintenance and potentially greater efficiency of selective breeding [7]. Recently, we developed a suitable protocol for sperm cryopreservation of *B. insignis* using methylglycol as cryoprotectant combined with commercial extenders such as Beltsville Thawing Solution (BTS™) among others [8]. The same freezing medium was used with success in other species of the genus *Brycon*, such as *B. orbignyanus* [9] and *B. nattereri* [10]. Although the application of cryopreserved sperm has been encouraged [11], the fish performance produced with cryopreserved sperm has not been fully explored [12]. Questions regarding the viability and performance of fish progenies originated from cryopreserved sperm have been raised and suggested a cautionary approach to be taken before cryopreserved sperm is widely used in conservation programs [13]. Sperm cryopreservation impairs the physical cell structure and its DNA, and negatively affect sperm cell physiology and fertility in fish species [14,15,16,17,18]. It is not clear, however, whether these damages affects embryo development and progeny viability [13]. Recently, survival and development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos and juveniles [13,19], malformations and ploidy of the larvae of common carp *Cyprinus carpio* [20,21] and African catfish *Clarias gariepinus*

[22], originated from cryopreserved sperm were carried out. In these studies, no significant difference was found between progenies originated from frozen-thawed sperm and from the control (fresh sperm), or no difference can be attributed to the use of cryopreserved sperm. Similar studies on Neotropical fish species, however, have not received the same attention so far.

Thus, the aim of the present study was to investigate whether the process of sperm cryopreservation interfere with the post-thaw sperm motility, embryogenesis and larvae growth in *Brycon insignis*.

2. Material and methods

2.1 Fish handling, gamete collection and initial evaluation

All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation [23]. *B. insignis* broodfish were selected from circular tanks at the Hydrobiology and Aquaculture Station of the Energy Company of São Paulo (CESP) in Paraibuna city (23°23'10"S; 45°39'44"W), São Paulo state, Brazil, during the spawning season (January and February).

Males at ~4-5 years of age (277 ± 33 g) with detectable running sperm under soft abdominal pressure were given a single intramuscular dose of carp pituitary extract (Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at 3 mg/kg of body weight and maintained at ~25°C. Eight hours later, the

urogenital papilla was carefully dried, and sperm was hand-stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), and soon after collection, tubes containing sperm were placed in a Styrofoam box containing crushed ice ($5 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Contamination of sperm with water, urine or feces was carefully avoided. Immediately after collection, 5 μL of each sample was placed on a glass slide and observed with a light microscope (Model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at 400 x magnification. As fish sperm in seminal plasma should be immotile, any sperm motility observed was attributed to urine or water contamination and the sample discarded. In immotile samples, sperm motility was triggered in 25 μL 1% NaHCO_3 (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) as activating agent and subjectively estimated under light microscope according to our methodology established for species of the *Brycon* genus [8,9,10,24]. Only samples with at least 90% motility were used in the subsequent analysis. Qualitative motility scores were assigned ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming spermatozoa), according to Mounib et al. [25]. Sperm volume was determined. Sperm (~ 2 mL) of each male was centrifuged at 4.500 g for 30 min at room temperature and the osmolality of the seminal plasma measured cryoscopically (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany).

To harvest oocytes, three females of ~ 8 years of age (967 ± 153 g) with detectable running oocytes under soft abdominal pressure, received two doses of

carp pituitary extract (0.5 and 4.5 mg/kg body weight) at 12 h interval. Along with the second dose, females received a dose of human chorionic gonadotropin (Pregnyl™ Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA) at 1,500 IU hCG/kg body weight and were hand-stripped 8 h later, at ~25°C. The spawning weight, spawning index (spawning weight x 100/body weight), number of oocytes/g spawning and the number of oocytes/female were calculated, and the oocytes were used for fertilization trial as described below.

2.2 Sperm cryopreservation

Sperm was cryopreserved following the methodology previously described by Viveiros et al. [8]. A freezing medium comprising the combination of methylglycol (CH₃O(CH₂)₂OH; Vetec Química Fina Ltda™, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and Beltsville Thawing Solution (BTS™, Minitüb™, Tiefenbach/Landshut, Germany) was used. BTS™, a boar sperm extender, was prepared with deionized water at 5% (0.02% gentamycin sulfate, 4.0% glucose, 0.63% sodium citrate, 0.13% EDTA, 0.13% NaHCO₃, 0.08% KCl) and adjusted to a pH of 7.6. Sperm samples (*n* = 6 males) were diluted to a final proportion of 10% sperm, 10% methylglycol and 80% BTS™. Then, sperm samples were loaded into 0.5 mL straws (*n* = 6 replicate straws/male) and frozen in a nitrogen vapor vessel (dry vapor shipper; YDH-8, Chengdu Golden Phoenix Liquid Nitrogen Container Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, China) at ~170°C. Using this

methodology, straws reach -170°C after ~ 329 sec in a freezing rate of approximately $-35.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ between 21°C and -170°C [24]. Straws were transferred to liquid nitrogen (cryogenic tank YDS-20, Chengdu Golden Phoenix Liquid Nitrogen Container Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, China) at -196°C within 20 to 24 h for storage.

Two days after freezing, half of the frozen replicate straws were thawed at 60°C for 8 sec, and used for fertilization trial. The remaining straws were used for sperm motility evaluation 9 months after freezing, as described below.

2.3 Post-thaw sperm motility and velocities

Half of the replicate straws ($n = 3$ replicate straws x 6 males) were transferred back to the nitrogen vapor vessel and transported by car from Aquaculture Station at CESP to the Laboratory of Semen Technology at the Federal University of Lavras (UFLA), Minas Gerais state, Brazil (~ 450 km). After arrival, straws were plunged back into liquid nitrogen. After 9 months, straws were thawed in a 60°C water bath for 8 sec [8], and post-thaw sperm motility was immediately estimated, both subjectively as described for fresh sperm and objectively using CASA system. Motility was first triggered in eppendorf tubes and then transferred to a LejaTM 20 microns counting chamber slide placed on a phase contrast microscope (NikonTM ECLIPSE E200, Japan), 100 x magnification, green filter, and pH 1 position. The microscope was

connected to a video camera (Basler Vision Technologies™ A602FC, Ahrensburg, Germany) which generated 25 images/sec and video recording started 10 s post-activation. Each image ($n = 25$) was analyzed using the standard settings for fish by Sperm Class Analyzer™ software (SCA™ 2005, Microptics, S.L. Version 4.1, Barcelona, Spain). Sperm was considered immotile when velocity was $< 10 \mu\text{m}/\text{sec}$. Although SCA™ simultaneously assessed more than 15 sperm motility endpoints. For brevity, only curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), and average path velocity (VAP) were considered for further analysis. To determine these velocities, each individual spermatozoon ($n =$ at least 500 spermatozoa/straw) was followed throughout the 25 images and a sperm trajectory was calculated.

2.4 Fertilization process

One replicate straw of each male was thawed and pooled ($n = 3$ pools of 6 straws from different males). Then 2.3 mL of each pool of sperm was mixed with 50 g of oocytes of each female ($n = 3$). In order to control the oocyte quality, three pools of freshly collected sperm from other males (1 pool = sperm of 3 males) were diluted 1:25 in BTS™ and 2.3 mL were used to fertilize 3 aliquots of 50 g of oocytes from the same females (1 pool of sperm = 1 aliquot of oocyte from each female). Fertilization was initiated by the addition of 46 mL tank water and mixed for 1 min. Subsequently, 184 mL tank water was added

and samples mixed for another 2 min. Finally, eggs were transferred to six 250-L funnel-type incubation units (performing three batches of oocytes fertilized with cryopreserved sperm and three batches of oocytes fertilized with fresh-control sperm) and incubated in a flow-through system at 23 to 24°C.

2.5 Embryogenesis

Approximately 80 embryos from each incubation unit ($n = 3$ incubation unit / progeny type) were randomly evaluated 1.5 and 10 h after fertilization when embryos are at the cleavage and gastrula stage with ~90% epiboly [26]. The embryos were placed in Petri dishes, examined under the stereomicroscope (TIM 2T, Opton), and placed back into the incubation unit. The hatching rate and the percentage of normal larvae were calculated. Recently hatched larvae were examined under stereomicroscope and photographed with a digital camera (DSC-W35, Sony Electronic Inc, New York, NY, USA) connected to the stereomicroscope.

2.6 Larvae growth

All larvae were transferred to two concrete tanks (one tank for each progeny type: originated from cryopreserved or fresh sperm) at 7 dph. At this point, larvae ($n = 18$ per progeny type) were fixed with 70% ethanol and kept under refrigeration. After that, fixed larvae were individually weighed (Semi-

Analytic Balance JA 3003n Bioprecisa, Equipar Ltda, Curitiba, Paraná, Brazil), photographed and measured using the software Adobe Photoshop CS4 Extend™ (Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, USA). At 30 dph, fries ($n = 16$ per progeny type) were weighed and measured (standard length) using a common ruler. At 60 and 112 dph, fingerlings ($n = 35$ per progeny type) were weighed and measured using an ichthyometer.

2.7 Statistical analysis

Values are reported as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted with the software R, version 2.12.0 [27]. In all experiments, data were tested for normal distribution using the univariate procedure. Data were tested for significant differences by analysis of variance (ANOVA). The level of significance for all statistical tests was set at 0.05.

3. Results

3.1 Initial gamete evaluation

B. insignis males ($n = 15$) possessed a mean of 98% motile sperm, quality motility score of 4.7 and volume of 4.4 mL. The osmolality of seminal plasma was 340 mOsm/Kg (Table 1).

Recently stripped oocytes possessed a mean spawning weight of $164 \pm$

13g, spawning index of $16.9 \pm 0.1\%$, 537 ± 12 oocytes/g spawning, $87,803 \pm 6,367$ oocytes/ female.

Table 1. Male body weight and quality of fresh sperm (n = 15 males; mean \pm SD; minimum-maximum values) of tiete tetra *Brycon insignis* after hormone treatment

Characteristics	Mean \pm SD	Range
Body weight (g)	277 ± 33	245 - 335
Subjective motility (%)	98 ± 4	90 - 100
Quality motility score (0-5) ¹	4.7 ± 0.5	4 - 5
Sperm volume (mL)	4.4 ± 2.5	1 - 8.8
Osmolality of seminal plasma (mOsm/kg)	340 ± 20	306 - 390

¹ Qualitative motility score was assigned ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming spermatozoa).

3.2 Post-thaw sperm motility and velocities

Post-thaw subjective motility and quality motility score significantly decreased from 100% motile sperm and score 5 in fresh sperm to 53% motile sperm and score 3 in cryopreserved sperm ($P < 0.05$). Sperm motility subjectively evaluated using a light microscope (53%) was not different ($P > 0.05$) from motility evaluated using CASA (55%). Post-thaw sperm possessed

76 $\mu\text{m}/\text{sec}$ of VCL, 63 $\mu\text{m}/\text{sec}$ of VSL and 71 $\mu\text{m}/\text{sec}$ of VAP (Table 2).

Table 2. Motility features (n = 6 males; mean \pm SD) of fresh sperm (subjective evaluation) and sperm cryopreserved (subjective and CASA) in methylglycol and BTS™ of tiete tetra *Brycon insignis*

Parameters	Fresh	Cryopreserved
Quality motility score (0-5) ¹	5 \pm 0 ^a	3 \pm 1 ^b
Subjective motility (%) ²	100 \pm 0 ^a	53 \pm 16 ^b
CASA motility (%) ²	ND	55 \pm 18
Curvilinear velocity $\mu\text{m}/\text{sec}$	ND	76 \pm 16
Straight-line velocity $\mu\text{m}/\text{sec}$	ND	63 \pm 15
Average Path $\mu\text{m}/\text{sec}$	ND	71 \pm 17

^{a,b}: Means in the same line followed by different superscripts are different (P < 0.05).

¹ Qualitative motility score was assigned ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming spermatozoa).

² Post-thaw sperm motility evaluated by either subjectively or CASA did not differ (P > 0.05)

ND not determined

3.3 Embryogenesis

Embryos originated from cryopreserved sperm developed similarly to embryos originated from fresh sperm. All the viable embryos at 1.5 h and between 10 to 11 h after fertilization were at the cleavage (56-68%) and gastrula (24%) with ~90% epiboly respectively. Hatching occurred 30 h after fertilization

and a rate of 24% was observed for both progenies.

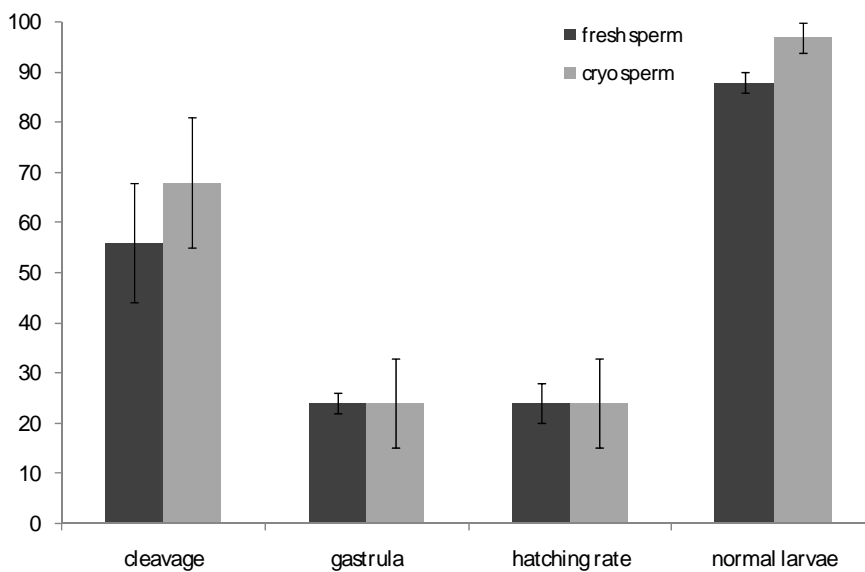


Figure 1. Percentage of embryos (n = 240; mean \pm sd) at the cleavage and gastrula (> 90% epiboly.) stages, hatching rate and normal hatched larvae of tiete tetra *Brycon insignis*
 * progenies originated from fresh sperm and sperm cryopreserved in methylglycol and BTS™. ANOVA (P > 0.05)

The percentage of normal larvae varied from 88 to 97% (Fig 1 and Fig 2) with no difference (P > 0.05) between progenies.

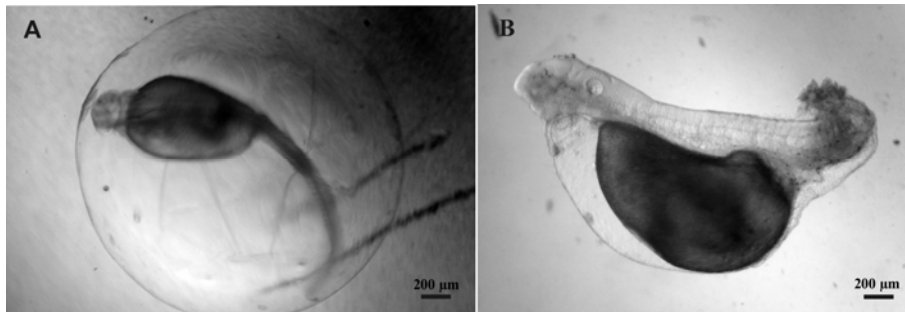


Figura 2. Larvae of tiete tetra *Brycon insignis*. A – normal larvae ready for hatching; B – recently hatched malformed larvae observed in both progenies from fresh sperm and sperm cryopreserved

3.4 Larvae growth

Specimens originated from cryopreserved and fresh sperm developed similarly ($P > 0.05$) during the 112 days of experiment. Specimens increased from 1.3-1.6 cm of standard length and 0.03-0.04 g of body weight at 7 dph, up to 12-13.8 cm of standard length and 35.4-45.9 g of body weight at 112 dph (Table 3).

Table 3. Standard length (SL) and body weight (BW) (mean \pm SD) of progenies originated from fresh sperm and sperm cryopreserved in methylglycol and BTS™ at 7, 30, 60, 112 days post-hatching (DPH) of tiete tetra *Brycon insignis*

DPH	N° specimens	Progenies			
		Fresh		cryopreserved	
		SL (cm)	BW (g)	SL (cm)	BW (g)
7	18	1.3 \pm 0.3	0.03 \pm 0.01	1.6 \pm 0.2	0.04 \pm 0.01
30	16	4.9 \pm 0.4	2.8 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0	3.1 \pm 2.4
60	35	10.0 \pm 1.2	15.2 \pm 8.0	9.2 \pm 1.2	13.3 \pm 7.0
112	35	13.8 \pm 1.8	46 \pm 21.0	12.0 \pm 1.5	35.4 \pm 11.0

There was no difference of standard length or body weight between progenies originated from fresh and cryopreserved sperm (ANOVA $P > 0.05$)

4. Discussion

Following the development of a methodology to cryopreserve sperm of *B. insignis* [8], the present study investigated the effects of cryopreservation on the post-thaw sperm motility, embryogenesis (cleavage, gastrula and hatching rate) and larvae growth. It were used the subjective method and the CASA system for evaluating the post-thaw sperm quality.

4.1 Initial gamete evaluation

Fresh sperm motility rate (98%), quality motility score (4.7), volume (4.4 mL), and seminal plasma osmolality (350 mOsmol/kg) of the 15 males utilized in this study were all within the range previously observed for this species [8,26] and other species of the subfamily Bryconinae [28].

Recently stripped oocytes and spawning characteristics were all similar to previous observation of this species [5,26]. A better knowledge regarding characteristics of fresh sperm and oocytes is necessary to evaluate gamete quality in commercial hatcheries prior to artificial reproduction in laboratories and prior to experiments.

4.2 Post-thaw sperm motility and velocities

The cryopreservation process involves temperature reduction, cellular dehydration, freezing and thawing. Cellular damage in different degrees is induced by distinct mechanisms at each of the cryopreservation phases, and the functional state of the frozen-thawed spermatozoa is the result of the injuries accumulated throughout the freezing and thawing process [29]. The use of sperm cryopreservation in aquatic species raises concerns about damages to spermatozoa during freezing and thawing. Some studies report issues of altered cell membrane integrity and damages to cellular organs [30,31].

Subjective sperm quality of *B. insignis* decreased from 100% motile sperm and score 5 in fresh sperm to 53% motile sperm and score 3 after freezing

and thawing. Studies carried out in Characiformes have assessed the effects of cryopreservation on sperm motility (subjectively or under CASA system), vitality, mitochondrial function and fertilization rates, and most of them have found moderate reduction in at least one of these parameters when compared to fresh sperm [7,9,10,24,32,33]. However, studies on fish sperm cryopreservation of species of the genus *Brycon* such as *B. amazonicus* [34,35], *B. cephalus* [36], *B. orbignyanus* [9,24], *B. orthotaenia* [37], and including *B. insignis* [8] were published suggesting effective protocols. The quality of the post-thaw sperm is mostly evaluated in terms of its subjective progressive motility, by using a light microscope and in species of the genus *Brycon* this rates ranging from 33 to 39% in *B. amazonicus* [38] and up to 72% in *B. nattereri* [10].

There was no significant difference between the two methods used when post-thaw sperm motility of *B. insignis* was evaluated subjectively - by a light microscope (53% motile sperm) and an objectively, with CASA system (55% motile sperm). Similarly, in other Characiformes, pirapitinga *Piaractus brachypomus* [33] and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* [39], there was no significant difference when post-thaw sperm motility was analyzed subjectively or using CASA. The CASA system, quantifies the sperm movement using at least a dozen computer-calculated motility characteristics, providing a objective methods of assessment that is easy to perform, precise and rapid [40]. For analyses these indicators of sperm quality, CASA is the most objective and

comprehensive quantification method currently available [41]. On the other hand, the sperm motility subjectively evaluated is very practical and can be conducted by well-trained personnel in commercial fish farms as an acceptable sperm quality evaluation.

In the present study, sperm cryopreserved in methylglycol and BTS™ yielded 55% motile sperm, VCL 76 µm/sec, VSL 63 µm/sec, and VAP 71 µm/sec when analyzed under CASA by 25 images/sec. In a previous study, sperm of the same species was diluted in DMSO, glucose and egg yolk in six different dilutions, frozen in nitrogen vapor vessel, thaw at 30°C/7 sec, triggered in NaHCO₃ and evaluated under CASA by 50 images/sec [4]. The highest values were observed at the dilution 1:6 (sperm:extender): motility rate 86%, VCL 82 µm/sec, VSL 25 µm/sec, and VAP 68 µm/sec. However, when sperm of the same males was diluted 1:10 proportion, the values observed were motility rate 22%, VCL 10 µm/sec, VSL 1 µm/sec, and VAP 9 µm/sec [4]. Although motility was different between dilution ratios and studies; VCL and VAP values were similar [4, and present study]. Cryopreserved sperm of two other Characiformes species were evaluated under CASA by 25 images/sec. in *P. brachypomus* sperm cryopreserved in methylglycol and glucose yielded 81% motile sperm, VCL 60.0 µm/sec, VSL 33 µm/sec and VAP 46 µm/sec [33] and *P. lineatus* sperm cryopreserved in methylglycol and ACP™ (powdered coconut water) yielded 85% motile sperm VCL 54 µm/sec, VSL 24 µm/sec, and VAP 37

$\mu\text{m}/\text{sec}$ [39]. In these four studies, we can observe a species-specific sensibility of spermatozoa to the freezing and thawing process, indicating that the definition of a freezing protocol should be done in a species-based. Therefore, the use of CASA is important as a method to evaluate sperm quality, as motility rate and sperm velocity have been associated with reproductive success in fish. In the study carried out in *P. lineatus*, there were positive correlations between fertilization rates and all sperm velocities, with the highest correlation ($r = 0.8$) for VCL [39]. Similarly positive correlations between progressive sperm motility velocities (VCL, VSL, and VAP) and fertilization were also reported for *Clarias gariepinus* [40], *Cyprinus carpio* [20] and *Oncorhynchus mykiss* [42].

4.3 Embryogenesis

Due to the difficulty in obtaining high quality eggs in this subfamily, only few studies tested post-thaw sperm for fertilization. In *B. insignis*, artificial reproduction using fresh sperm yields hatching rates that varies from 0 to 85% [5]. In our recent study, a fertilization rate of 26% was observed [27] and rates below 30% are frequent at Aquaculture Station of CESP (D. Caneppele, personal observation).

Embryos at two different stages were observed in *B. insignis* progenies originated from fresh and cryopreserved sperm. At 1.5 h, all the viable embryos originated from fresh or cryopreserved sperm were at the cleavage stage.

Between 10 to 11 h after fertilization, the viable embryos were at the gastrula stage end (~90% epiboly nearly to the blastopore closure), and the rate observed was of 24% for both progenies similarly to our previous result reported (26%) [26]. The gastrula stage end (blastopore closure) is considered the moment most appropriate for the determination of fertilization rate as nonfertilized eggs develop parthenogenetically until prior to blastopore closure [43]. This fact, could explain the significant decrease in survival rates from cleavage to gastrula stage observed in both progenies. Hatching rates of 24% also were observed for both progenies types, so there was no difference on data of fertilization rate and hatching for both embryos originated from fresh or cryopreserved sperm. Physical damage to sperm cells, such as membrane ruptures and tail breakage due cryopreservation process can prevent successful fertilization [19]. The results here observed showed that the embryogenesis stages were not affected by sperm cryopreservation as embryos originated from both progenies developed similarly. Others authors have reported no differences in survival of progeny produced using fresh and cryopreserved sperm [19]. Fertilization studies using rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cryopreserved sperm suggested that decreased survival of progeny as a result of an inability of the sperm to successfully initiate fertilization, and not as a result of cryopreservation process [14,19]. No difference was detected regarding to developmental parameters (survival between stages, ploidy, deformities and asymmetry analysis) of

progeny of *Oncorhynchus mykiss* using fresh or cryopreserved sperm embryos [19]. Maternal effects influence rainbow trout embryo survival using fresh [44] and cryopreserved sperm [45] and are more important than paternal variation or sperm 'freezability' [19].

Successful fertilization of eggs with sperm containing DNA damage would potentially increase the mutation rate and negatively alter the phenotype of fish produced using cryopreserved sperm [19]. No significant differences on the percentage of normal larvae between progenies originated from fresh and cryopreserved sperm were observed. In fact, the highest value (97% normal larvae) was observed in the progeny originated from cryopreserved sperm. Therefore, the presence of malformed larvae can not be attributed to the use of cryopreserved sperm. Similar results were observed in *Cyprinus carpio* [20,21] and in *Clarias gariepinus* [22] for which the use of cryopreserved sperm did not affect the number of the malformed larvae. Furthermore, *Clarias gariepinus* malformed larvae were examined by chromosome preparations and most of these were diploid, indicating that the larval malformation was not result from genetic problems [22]. Rates of normal or malformed larvae are more likely to be attributed to inadequacies of the incubation process [21], eggs quality or rearing conditions of fish [22].

4.4 Larvae growth

Larvae growth evaluated in terms of standard length and the body weight were similar between progenies originated from fresh or cryopreserved sperm during all period evaluated (112 dph). Studies regarding larvae development, growth and performance of fish progenies originated from cryopreserved sperm have received little attention so far. This is a first report on larval survival of *B. insignis* originated from cryopreserved sperm. Similarly, progenies of channel catfish *Ictalurus punctatus* originated from cryopreserved and control groups developed similarly during one year of rearing [46]. On the other hand, striped bass *Morone saxatilis* larvae originated from cryopreserved sperm was significantly larger than the control after a rearing period of 45 or 47 days [47].

5. Conclusions

Motility rate and quality motility score decreased significantly after sperm cryopreservation. However, embryos and larvae originated from cryopreserved sperm developed similarly to the progeny originated from fresh sperm. Based on these findings, cryopreserved sperm can be used as a tool to restore the population of endangered species such as *B. insignis*, as well as for aquaculture purposes without any concern regarding the progeny quality.

Acknowledgements

This research was supported by FAPEMIG (projects: CVZ 1609-06; APQ 2578-5-04-07; CAEG APQ 02715-02), CNPq (grants: 141748/2008-7) and CESP/ANEEL (project: 0061-017/2006). The authors warmly thank the Hydrobiology and Aquaculture Station of CESP for providing broodfish, A.N. Marchetti (Minitub do Brasil Ltda., Porto Alegre, RS, Brazil) for providing boar sperm extenders, and T.S.G. Carvalho and I.C. Carvalho (UFLA) for assistance during the experiments. The authors thank, moreover, Dr M.C. Leal for his critical review of the manuscript.

6. References

- [1] Froese R, Pauly D. Editors. FishBase. World Wide Web Electronic publication. 2010. www.fishbase.org, version (03/2010).
- [2] Hilsdorf AWS, Petrere Jr M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *C Hoje* 2002;30:62-5.
- [3] Machado CEM, Abreu ECF. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo - I). A pesca no vale do Paraíba. *Bol Ind Animal* 1952;13 145-60.

- [4] Shimoda E. Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 121p. PhD Thesis. State University Norte Fluminense (UENF) Darcy Ribeiro, Goytacazes, RJ, Brazil, 2004.
- [5] Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Narahara MY, Fenerich-Verani N. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro. R Bras Zootec 2002;31:803–11.
- [6] Rosa RS, Lima FCT. Os peixes ameaçados de extinção. In: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (Ed.), Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas. Brasília, Brazil, 2008, pp. 9-285.
- [7] Viveiros ATM, Orfão LH, Maria NA, Allaman IB. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Anim Reprod Sci 2009;112:293-0.
- [8] Viveiros ATM, Amaral TB, Orfão LH, Isau ZA, Caneppele D, Leal MC. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. Aquac Res 2010. In Press (doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x).

- [9] Maria NA, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) sperm, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 2006;260:298-06.
- [10] Oliveira AV, Viveiros ATM, Maria AN, Freitas RTF, Isau ZA. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007;59:1509-15.
- [11] Chao NH, Liao IC. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 2001;197:161–89.
- [12] Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac Res* 2000;31:231-43.
- [13] Hayes MC, Rubin SP, Hensleigh JE, Reisenbichler RR, Wetzel LA. Performance of juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced from untreated and cryopreserved milt. *Aquaculture* 2005;249:291–02.
- [14] Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Devel* 2001;60:, 397–04.

- [15] Cabrita E, Robles V, Alvarez R, Herraéz MP. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 2001;201:301–14.
- [16] Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 2003;47:227–35.
- [17] Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology* 2004;61:1661–73.
- [18] Cabrita E, Robles V, Cunado S, Wallace JC, Saraquete C, Herraéz MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 2005;50:273–84.
- [19] Young WP, Frenyea K, Wheeler PA, Thorgaard GH. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 2009;289:13–8.

- [20] Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos, *Cryobiology* 2000;41:241–50.
- [21] Horváth A, Miskolczi E, Mihálffy S, Osz K, Szabó K, Urbányi B. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2007;54:251–57.
- [22] Miskolczi E, Mihálffy S, Várkonyi EP, Urbányi B, Horváth A. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 2005;247:119–25.
- [23] Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of Laboratory Animal Science – A Contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Experimental Results. Revised edition. Elsevier, Amsterdam 1993.
- [24] Maria NA, Viveiros ATM, Orfão LH, Oliveira AV, Moraes GF. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Anim Reprod* 2006;3: 55-60.

- [25] Mounib NS, Hwang PC, Idler DR. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. J Fish Res Board Can 1968;25:2623-32.
- [26] Isaú ZA, Rizzo E, Amaral TB, Mourad NMN, Viveiros ATM. Structural analysis of oocytes, post-fertilization events and embryonic development of the Brazilian endangered teleost *Brycon insignis* (Characiformes). Zygote 2010; submitted.
- [27] R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing. 2010. Version 2.12.0.
- [28] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiol Biochem 2009;35:137-50.
- [29] Li J, Liu Q, Zhang S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. Chin J Ocean Limnol 2006;24:370-77.
- [30] Cabrita E, Alvarez R, Anel L, Rana K J, Herraes MP. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm, Cryobiology 1998;37:245–53.
- [31] Baulny BO, Labbe C, Maise G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*)

testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants.

Cryobiology 1999;39:177–84.

[32] Viveiros ATM, Oliveira AV, Maria NA, Orfão LH, Souza JC. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. Arq Bras Med Vet Zootec 2009;61:883-89.

[33] Nascimento AF, Maria NA, Pessoa NO, Carvalho MAM, Viveiros ATM. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). Anim Reprod Sci 2010;118:324-29.

[34] Cruz-Casallas PE, Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). R Colom Cienc Pecuar 2006;19(2):152-9.

[35] Ninhaus-Silveira A, Veríssimo-Silveira R, Senhorini JA, Alexandre JS, Chaguri MP. Fertilidade do sêmen criopreservado de matrinxã, *Brycon amazonicus* criopreservado em nitrogênio líquido. Bol Técn CEPTA 2006;19:1-8.

- [36] Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Veríssimo-Silveira R, Senhorini JA. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Braz Arch Biol Techn* 2006;49:651-59.
- [37] Melo FCSA, Godinho HP. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim Reprod* 2006; 3:380-85.
- [38] Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas PE. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture* 2006;256:264-71.
- [39] Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 2010;74:551-56.
- [40] Rurangwa E, Volckaert FAM, Huyskens G, Kime DE, Ollevier F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* 2001;55:751-69.
- [41] Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 2007;67:661-72.

- [42] Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 2000;54:1477–98.
- [43] Perini VR, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N. Biology of eggs, embryos and larvae of *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces: Siluriformes). *Zygote* 2010;18:159-71.
- [44] Nagler JJ, Parsons JE, Cloud JG. Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2000;184:177–83.
- [45] Baynes SM, Scott AP. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture* 1987;66:53–67.
- [46] Tiersch TR, Goudie CA, Carmichael GJ. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Trans Am Fish Soc* 1994;123:580–86.
- [47] Kerby JH, Bayless JD, Harrel RM. Growth, survival, and harvest of striped bass produced with cryopreserved spermatozoa. *Trans Am Fish Soc* 1985;114:761-65.

Versão preliminar sujeito à alterações pelo conselho editorial da revista.