

PARÂMETROS QUALITATIVOS DO SÊMEN DE DOURADO (*Salminus maxillosus*) EM CATIVEIRO*

Danilo Pedro STREIT Jr. ¹; Rodolfo Nardez SIROL ²; Ricardo Pereira RIBEIRO ³;
Gentil Vanini de MORAES ³; Juliana Minardi GALO ³; Melanie DIGMAYER ³

RESUMO

Foram avaliadas as características seminais do dourado (*Salminus maxillosus*) analisando-se o sêmen de 35 animais antes e após a indução hormonal com extrato de hipófise carpa. A motilidade progressiva aumentou de 67,31% para 76,31% no sêmen avaliado após-indução hormonal; porém não houve diferença com relação ao vigor espermático entre as amostras de sêmen avaliadas. Se no sêmen analisado antes da indução hormonal a concentração de espermatozóides foi de $15,92 \times 10^9$ espermatozóides/mL, nas amostras coletadas após a indução hormonal, esta concentração foi menor. Os espermatozóides normais estiveram presentes em 56,74% dos espermatozóides avaliados no sêmen antes da indução hormonal, enquanto que no avaliado após a indução hormonal este percentual foi menor ($P < 0,05$) 48,01%. Não houve diferença entre as frequências de patologias, primárias nos tratamentos avaliados. Nas secundárias, registrou-se um aumento ($P < 0,05$) do percentual, passando de 13,3%, sêmen antes da indução, para 19,02% no sêmen após a indução hormonal. Cauda quebrada (primária) e cauda dobrada (secundária) foram às patologias verificadas com maior frequência em ambos os tratamentos.

Palavras-chave: espermatozóides, morfologia espermática, motilidade progressiva, vigor espermático

QUALITATIVE PARAMETER OF DOURADO (*Salminus maxillosus*) SEMEN IN CAPTIVITY

ABSTRACT

Seminal characteristics of thirty-five dourado (*Salminus maxillosus*) fishes were investigated under pre- and post-hormonal induction by extract of carp pituitary. The progressive motility was increased from 67.31% up to 76.31% after the hormonal treatment unlike the spermatoc vigor which had similar performance under both conditions. The spermatozoa concentration was reduced from 15.92×10^9 before the hormonal induction to 13.13×10^9 spermatozoa/mL⁻¹ ($P < 0.05$) after the hormonal induction. The percentage of normal spermatozoa in pre-hormonal induction was 56.74%; the estimate in post-hormonal induction was 48.01%: a significant reduction ($P < 0.05$). No significant differences were detected in the percentage of primary pathologies, but in the secondary ones the estimate of 13.3% in pre-hormonal induction was increased ($P < 0.05$) up to 19.02% in post-hormonal induction. Bent tail (primary) and shoehook tail (secondary) were the most frequent morphological pathologies.

Key words: spermatozoa, spermatozoa morphology, progressive motility, spermatoc vigor

Artigo Científico: Recebida em: 09/11/2006; Aprovada em: 18/04/2007

* Pesquisa realizada com apoio da DUKE ENERGY –Geração Paranapanema S.A

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Agronomia, Departamento de Zootecnia – Avenida Bento Gonçalves, nº 7712 – Bairro Agronomia - Cep. 90001-970, Porto Alegre – RS. E-mail: danilo.streit@ufrgs.br

² Gerência de Meio Ambiente da DUKE ENERGY –Geração Paranapanema S.A. Rodovia Chavantes – Ribeirão Claro, Km 10. Cep. 18970000 – Chavantes – SP. E-mail: rnsirol@duke-energy.com

³ Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Zootecnia – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Av. Colombo, 5790 – Cep. 87020900 – Zona 07, Maringá – PR. E-mail: rpribeiro@uem.br ; gvmoraes@uem.br

INTRODUÇÃO

Inúmeros fatores bióticos e abióticos podem afetar a qualidade do sêmen de peixes, dentre eles a indução hormonal, indicada para a obtenção da liberação de sêmen, quando os animais encontram-se confinados, pode comprometer a qualidade dos gametas RURANGWA *et al.* (2004). Entretanto, um grande número de espécies de elevado valor econômico necessitam de indução hormonal, pois não são capazes de liberar, espontaneamente, gametas quando mantidos em cativeiro (DONALDSON e HUNTER, 1983).

A viabilidade dos espermatozóides é essencial para que o processo reprodutivo seja eficiente em peixes. Deste modo, a motilidade progressiva constitui-se em um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade do sêmen (HONEYFIELD e KRISE, 2000). O vigor espermático é uma medida indireta da natção dos espermatozóides (VERMEIRSEN *et al.*, 2003). As deformações estruturais dos espermatozóides (anormalidades morfológicas) podem causar sensível redução na motilidade dos espermatozóides e, por conseqüência, perda da capacidade de fertilização (RURANGWA *et al.*, 1998; COSSON *et al.*, 1999). Todavia, RURANGWA *et al.* (2004) sugeriram que os espermatozóides apresentam qualidade, quando realmente são eficientes na fertilização de ovócitos.

Estudos que avaliam as características seminais de espécies de peixes sul-americanos, como *Piaractus mesopotamicus* (SILVEIRA *et al.*, 1990), *Prochilodus lineatus* (KAVAMOTO *et al.*, 1997), *Steindachneridion scripta* (LUZ *et al.*, 2001), *Brycon opalinus* (NARAHARA *et al.*, 2002), *Brycon insignis* (TALMELLI *et al.*, 2001) e *Brycon siebenthalae* (CRUZ-CASALLAS *et al.*, 2005), têm sido conduzidos nos últimos anos, afim de se conhecer o real potencial de cada espécie para a piscicultura. Quanto a estudos que reportem a morfologia espermática dos espermatozóides pouco se sabe sobre peixes migradores sul-americanos (KAWAMOTO *et al.*, 1999). Todavia, alguns trabalhos têm sido publicados nos últimos anos abordando este assunto, como MURGAS *et al.* (1999) trabalhando com piapara (*Leporinus obtusidens*); KAWAMOTO *et al.* (1999) com curimatá (*Prochilodus lineatus*) e MORAES *et al.* (2004) com curimatá (*P. lineatus*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). Com relação a estudos que reportem parâmetros reprodutivos do *Salminus maxillosus* não são muitos. Todavia, sabe-se que, em razão de adaptações evolutivas, os espermatozóides desta espécie caracterizam por fertilizar os óvulos

externamente (água) e por isso são classificados como "aquaspermatozóides" (GRASSIOTTO *et al.*, 2001). Nos estudos de COSER *et al.* (1983) e CARROLSFELD *et al.* (2003) foram protocoladas soluções diluídas para a criopreservação do sêmen de *S. maxillosus*. Curiosamente não foram encontrados trabalhos que avaliem parâmetros qualitativos do sêmen desta espécie.

O dourado (*Salminus maxillosus*) ainda não se constitui em uma das cinco principais espécies nativas produzidas no Brasil (BORGHETTI *et al.*, 2003). Todavia, outras qualidades, como seu apelo comercial (OLIVEIRA e NOGUEIRA, 2000) e sua utilização na pesca esportiva, tornam esta espécie potencialmente promissora, tanto para aqüicultura como para programas ambientais das suas bacias hidrográficas de origem. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) destaca o dourado (*S. maxillosus*) como espécie brasileira promissora a ser desenvolvida (QUEIROZ *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi verificar a qualidade do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) antes e após indução hormonal com extrato de hipófise de carpa.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação de Hidrologia e Aquacultura da DUKE ENERGY INTERNATIONAL - Geração Paranapanema S.A. e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, durante os meses de janeiro e fevereiro de 2004.

Para o estudo coletou-se sêmen de 35 dourados (*S. maxillosus*) selvagens, oriundos do rio Paranapanema, alocados pelo período de um ano na Estação de Hidrologia e Aquacultura da DUKE ENERGY INTERNATIONAL. Para a indução hormonal dos animais utilizaram-se 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peixe em dose única.

No laboratório, os peixes foram identificados por número fixados com fio de náilon à nadadeira dorsal sendo, em seguida, realizado o procedimento de coleta do sêmen para análise. A coleta de sêmen, antes e após a indução hormonal, foi realizada utilizando-se seringas graduadas de 5 mL (BILLARD *et al.*, 1995). Em média, coletaram-se 2 ml de sêmen, direto no orifício urogenital previamente seco com toalha de papel macio, evitando-se contaminação com água, urina e fezes. Para a extrusão do sêmen

após a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa, estabeleceram-se 180 unidades térmica acumulada (UTA), por ser este o valor da UTA utilizado regularmente em programas de reprodução de dourado (*S. maxillosus*). A temperatura média da água dos tanques foi de 26,8°C.

As análises de motilidade progressiva, vigor espermático, concentração de espermatozóides e da morfologia dos espermatozóides foram realizadas utilizando-se microscópio ótico no aumento de 40x. Os procedimentos que foram realizados para análise do sêmen de dourado (*S. maxillosus*) são resumidos a seguir:

- *Motilidade progressiva e vigor espermático*: uma gota do sêmen coletado foi diluída em sete gotas de água destilada em uma lâmina. Em seguida, uma gota desta diluição foi colocada sobre lâmina de microscopia ótica e coberta por lamínula, sendo levada ao microscópio pré-ajustado para exame. Ao observar-se a lâmina, atribuíram-se valores de 0 a 100% para a motilidade progressiva e de 0 a 5 pontos para o vigor espermático.

- *Concentração de espermatozóides*: o sêmen foi diluído Becker contendo formol-salina tamponada, utilizando-se pipeta de precisão, resultando em diluição de 1:2.000. Feita a diluição, preencheu-se, por capilaridade, a câmara de Neubauer e contaram-se os espermatozóides de cinco quadrados do campo de 1 mm². Somando os espermatozóides contados nos referidos quadrados e dividindo por 80 quadrados pequenos, multiplicando por 400 quadrados pequenos, pela diluição e pela altura da câmara, obteve-se a quantidade de espermatozóides por mm³.

- *Morfologia*: para esta análise foi feito esfregaço com sêmen diluído em formol-salina tamponada, na proporção de 1:2000 (sêmen/solução diluente). Os esfregaços foram corados pelo método de Rosa Bengala, corante recomendado para peixes por STREIT Jr. *et al.* (2004), e depois de secos, levado ao microscópio, contando-se 100 a 130 espermatozóides, classificando-os em normais, com patologias primárias ou secundárias classificadas de acordo com HERMAN *et al.* (1994).

As patologias primárias avaliadas consistiram em: cauda quebrada, enrolada, curta, abaxial; cabeça degenerada; microcefalia; macrocefalia. Já as patologias secundárias analisadas compreenderam: cauda dobrada; cauda e cabeça soltas; gota citoplasmática proximal e distal.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em que o sêmen de *S. maxillosus* foi avaliado antes e depois da indução hormonal. Cada amostra de sêmen analisada foi considerada uma unidade experimental.

O modelo proposto foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = Observação do animal (j) que recebeu o tratamento (i);

μ = Constante geral;

T_i = Tratamento (i);

e_{ij} = erro aleatório associado ao animal (j) que recebeu o tratamento (i);

Para as análises estatísticas utilizou-se o procedimento GENMOD do SAS (1992), implementando-se a metodologia de MODELOS LINEARES GENERALIZADOS. Considerou-se que os erros possuíam distribuição de probabilidade de POISSON, com função de ligação logarítmica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sêmen avaliado antes da indução hormonal o valor médio para a motilidade progressiva foi de 67%, com valores variando entre 40 e 90%. Para o sêmen obtido após a indução hormonal a média foi de 76%, variando entre 50 e 90%. Porém, o vigor espermático, não diferiu ($P > 0,05$) entre os dois momentos. Quanto a concentração espermática antes da indução hormonal observou-se valor médio de $15,92 \times 10^9$ espermatozóides/mL, superior a média de $13,13 \times 10^9$ espermatozóides/mL no sêmen obtido após a indução hormonal (Tabela 1).

O efeito da estimulação hormonal com extrato de hipófise de carpa pode ser notado com o aumento significativo ($P < 0,05$) de 67 para 76% na motilidade progressiva. Porém, para o vigor espermático esta ação hormonal não foi verificada no sêmen após a indução hormonal, muito embora tenha sido observado. Na avaliação qualitativa do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*), FERREIRA *et al.* (2001) não encontraram diferença na motilidade espermática de animais estimulados e não estimulados com hormônio, sendo as médias, 88,30 e 72,50%, respectivamente. Para outras espécies como linguado (*Pleuronectes ferrugineus*), a motilidade progressiva, independente de ser elevada ou baixa, sempre foi influenciada por mudanças no metabolismo da progesterona nas gônadas, sendo então depende

da ação dos hormônios gonadais, como verificaram CLEARWATER e CRIM (1998). NAGAHAMA (1994) trabalhando com salmões e enguia observou maior

motilidade no sêmen analisado após a indução hormonal corroborando com as informações obtidas no presente estudo.

Tabela 1. Média e desvio padrão da motilidade progressiva, vigor espermático e concentração de espermatozóides verificados no sêmen de *S. maxillosus* antes e após a indução hormonal

PARÂMETROS	TRATAMENTOS	
	ANTES DA INDUÇÃO	APÓS A INDUÇÃO
Motilidade progressiva (%)	67,31±4,82b	76,31±3,80a
Vigor espermático (0 à 5 pontos)	2,92±0,18	3,16±0,14
Concentração de espermatozóides*	15,92±2,3a	13,13±1,8b

Letras diferentes, na mesma linha (P<0,05)

*x10⁹ espermatozóides/mL

Foi observada menor concentração de espermatozóides no sêmen após a indução hormonal (13,13X10⁹ espermatozóides/mL), em relação aos animais que não foram induzidos (15,92X10⁹ espermatozóides/mL). Este fato deve ter ocorrido em razão da ação hormonal, provocando uma maior produção do fluido seminal e deste modo, resultando numa diluição das células espermáticas e conseqüente diminuição na concentração de espermatozóides/mL. Esta situação foi observada no trabalho de SAAD e BILLARD (1987) que constataram redução de 20% na concentração espermática de *Cyprinus carpio*, após a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa. BEDORE (1999) também observou este fato ao induzir piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com extrato de hipófise de carpa, encontrando uma concentração de espermatozóides/ml, 29% inferior aos animais não induzidos.

No sêmen avaliado antes da indução hormonal, 56,74% dos espermatozóides presentes não apresentavam anormalidades morfológicas. Já, nas amostras analisadas após a indução hormonal o percentual de espermatozóides normais foi de 48,01%. Com relação as patologias primárias não houve diferença

(P>0,05) com relação a origem de cada sêmen, antes da indução hormonal (30,05%) e após a indução hormonal (33,35%). Por outro lado, no sêmen analisado antes da indução hormonal, o percentual de espermatozóides com patologias secundárias foram observados em menor (P<0,05) frequência (13,03%) do que nos espermatozóides observados no sêmen após a indução hormonal (19,02%) (Tabela 2).

Não existem estudos comprobatórios de que espermatozóides de peixes com anormalidades não fecundem. Todavia, sabe-se que as anormalidades espermáticas provocam limitação da motilidade do espermatozóide e, por conseqüência, redução da taxa de fertilização (COSSON *et al.* 1999; GILL *et al.*, 2002). O estímulo hormonal parece provocar o surgimento de espermatozóides com alterações morfológicas, como foi verificado no presente estudo, quando ocorreu significativa elevação nas patologias secundárias. Em curimatá (*Prochilodus scrofa*), KAVAMOTO *et al.* (1999) registraram aumento do número de espermatozóides com anormalidades, de 6,62%, antes da indução hormonal com extrato de hipófise de carpa, para 8,50%, 96 horas após a indução.

Tabela 2. Média e desvio padrão de espermatozóides normais, com patologias primárias e secundárias, verificados nas amostras de sêmen de *S. maxillosus* antes e após a indução hormonal

PARÂMETROS	TRATAMENTOS	
	ANTES DA INDUÇÃO	APÓS A INDUÇÃO
Espermatozóides normais	56,74±2,79a	48,01±3,06b
Espermatozóides c/patologias primárias (%)	30,05±2,36	33,35±2,81
Espermatozóides c/patologias secundárias (%)	13,03±1,40b	19,02±1,77a

Letras diferentes na mesma linha (P<0,05)

A determinação de percentuais aceitáveis de patologias primárias e secundárias com relação a prejuízos que possam provocar na taxa de fertilização pode, sem dúvida, contribuir para a otimização dos processos reprodutivos. No presente estudo, com *S. maxillosus*, o valor foi de 43,08 e 52,37%, somando-se as percentagens das patologias primárias e secundárias no sêmen avaliado antes e após a indução hormonal, respectivamente. Estes valores podem ser considerados elevados se comparados ao percentual de 30%, aceitável para mamíferos, como bovinos e eqüinos, de acordo com o COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (1998). Porém, semelhantes aos encontrados para outras espécies de peixes, *Leporinus macrocephalus* (49,00%), *Prochilodus lineatus* (50,02%) e *Cyprinus carpio* (37,60%) (MORAES *et al.*, 2004).

Três tipos de patologias primárias (cauda quebrada, cabeça degenerada e macrocefalia) verificadas nos espermatozoides após a indução hormonal (32,38;

0,14 e 0,13%, respectivamente) apresentaram maior percentual ($P < 0,05$) do que nos espermatozoides produzidos antes da indução hormonal (24,03; 0,00 e 0,00%, respectivamente). Não houve diferença percentual (1,33%) ($P > 0,05$) para a patologia microcefalia quando analisado antes e após a indução hormonal. As outras patologias primárias verificadas como cauda enrolada (19,16%), curta (13,62%) e abaxial (4,2%) nos espermatozoides produzidos antes da indução hormonal foram mais incidentes ($P < 0,05$) do que nos espermatozoides obtidos após a indução hormonal, (17,36%; 17,36 e 2,88). A patologia secundária mais freqüente foi do tipo cauda dobrada ($P < 0,05$) no sêmen obtido antes da indução hormonal (24,14%). Por outro lado, a patologia cabeça solta foi observada em maior percentual ($P < 0,05$) nas amostras de sêmen após a indução hormonal. E não houve diferença ($P > 0,05$) naquelas avaliadas antes e após a indução hormonal para a patologia cauda solta, 8,53 e 8,35%, respectivamente (Figura 1).

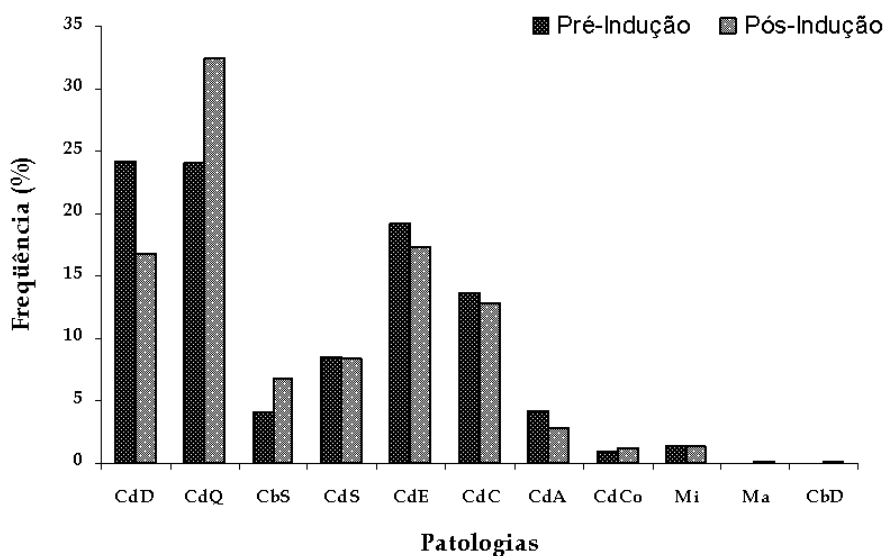


Figura 1. Frequência (%) de patologias primárias e secundárias: cauda dobrada (CdD), cauda quebrada (CdQ), cabeça solta (CbS), cauda solta (CdS), cauda enrolada (CdE), cauda curta (CdC), cauda abaxial (CdA), cauda corrugada (CdCo), microcefalia (Mi), macrocefalia (Ma), cabeça degenerada (CbD) verificados no sêmen de *S. maxillosus* antes e após a indução hormonal

Muito embora as patologias, gota citoplasmática proximal e distal tenham sido consideradas quando realizada a avaliação das lâminas, não houve registro destas patologias em nenhuma amostra.

Para HAFEZ e HAFEZ (2000), a origem de cada tipo de patologia não é clara em mamíferos. Porém, os autores afirmam que para algumas raças de boi, espermatozoides com a cauda enrolada e dobrada estão relacionados a elevados níveis de zinco nos

espermatozoides, assim como no líquido seminal. Na espécie *P. scrofa*, as patologias mais incidentes foram cauda dobrada e enrolada (primárias) e cabeça solta (secundárias), como registrou KAVAMOTO *et al.* (1999). Para HERMAN *et al.* (1994) a origem das patologias primárias nas células espermáticas pode estar relacionada com deficiência nutricional, idade dos machos, consangüinidade, além de doenças que possam acometer os reprodutores. Os

mesmos autores citam que a temperatura ambiente, doenças, alimentação do animal, problemas no ducto espermático, extrusão do sêmen, além da confecção dos esfregaços podem influenciar o aparecimento das patologias secundárias.

Na presente pesquisa, a microcefalia mostrou-se presente, porém, com valores que podem ser considerados baixos, (1,30%), tanto para sêmen obtido antes como após a indução hormonal, não sendo registrada a presença das patologias gota citoplasmática proximal e distal.

CONCLUSÕES

A indução hormonal com extrato de hipófise de carpa aumentou o percentual da motilidade progressiva no sêmen de *S. maxillosus*. Todavia, provocou uma redução na concentração de espermatozoides, no percentual de espermatozoides normais e houve um aumento na frequência de espermatozoides com patologias secundárias. Estas informações não foram suficientes para caracterizar perda ou ganho de qualidade após este tratamento reprodutivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEDORE, A.G. 1999. *Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (Piaractus mesopotamicus) e de piracanjuba (Brycon orbignyanus)*. Belo Horizonte. 52p. (Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, UFMG).
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. 1995. Broodstock management and seed quality-General considerations. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R.J. *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science. p.1-24.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. 2003. *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais. 128p.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, Londres, 63: 472-489.
- CLEARWATER, S.J. e CRIM, L.W. 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Bio-Chemistry*, Amsterdam, 19: 249-257.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA. 49p.
- COSER, A.M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. 1983. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 37: 387-390.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. *In the male gamete: From basic knowledge to clinical applications*. Paris: Cache River Pres. p.161-186.
- CRUZ-CASALLAS, P.E., LOMBO-RODRIGUEZ, D.A.; VELASCO-SANTAMARIA, Y.A. 2005. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research*, Oxford, 36: 682-686.
- DONALDSON, E.M. e HUNTER, G.A. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. *Fish physiology*. Orlando: Academic Press, p.352-403.
- FERREIRA, A.A.; NUÑER, A.P.O.; LUZ, R.K.; REYNALTE-TATAJE, D.A.A.; ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27: 57-60.
- GILL, M.E.; SPIROPOULOS, J.; MOSS, C. 2002. Testicular structure and sperm production in flounders from as polluted estuary: a preliminary study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Amsterdam, 281: 41-51.
- GRASSIOTTO, Q.; NEGRÄU, J.N.; CARVALHHO, E.D.; FORESTI F. 2001. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *Journal Fish Biology*, Londres, 59: 1494-1502.
- HAFEZ, E.S.E. e HAFEZ, B. 2000. *Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lippicott Williams e Wickins. 509p.

- HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. 1994. *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. Illinois: Interstate Publishers. 392p.
- HONEYFIELD, D.C. e KRISE, W.F. 2000. Measurement of milt quality and factors affecting viability. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p.49-58.
- KAVAMOTO, E.T.; PINTO, C.S.R.M.; TALMELLI, E.F.A.; CAMPOS, B.E.S. 1997. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 24: 71-78.
- KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S.; TALMELLI, E.F.A. 1999. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 25: 61-66.
- LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE-TATAJE, D.A. ZANIBONI FILHO E. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27: 39-42.
- MORAES, G.V.; STREIT JR., D.P.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E.D.; POVH, J.A. 2004. Ação de diferentes indutores hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 30: 109-116.
- MURGAS, L. D. S. ; MILIORINI, A. B. ; SILVA, M. O. B. ; FRANCISCATTO, R. T. ; MARIA, A. N. 1999. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 23: 246-248.
- NAGAHAMA, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal Of Development Biology*, Tokio, 38: 217-229.
- NARAHARA, M.Y.; TALMELLI, E.F.A.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. 2002. Reprodução induzida da pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 31: 1070-1075.
- OLIVEIRA, R.D. e NOGUEIRA, F.M.B. 2000. Characterization of the fishes and of subsistence fishing in the pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 60: 435-445.
- QUEIROZ J.F., LOURENÇO J.N.P.; KITAMURA P.C. 2006 *A Embrapa e a aquíicultura: demandas e prioridades de pesquisa*. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2002. 35p. (Texto para discussão, 11). Disponível em <<http://www22/sede.embrapa.br/unidades/uc/sge/>>. Acesso em 11 abr. 2006.
- RURANGAWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G.; EBRAHIMI, M.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. 1998. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal Fish Biology*, Londres, 53: 402-413.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, Amsterdam, 234: 1-28.
- SAAD, A. e BILLARD, R. 1997. Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, Amsterdam, 65: 67-77.
- SAS INSTITUTE INC. 1992. *SAS technical report*. Release 6.07. Cary: NC, 229p.
- SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLI, M.A.; GODINHO, H.M.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg), proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 17: 1-13.
- STREIT Jr., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, A.C.L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, 7: 157-162.
- TALMELLI, E.F.A.; KAVAMOTO, E.T.; VERANI, N.F. 2001. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27: 149-154.

VERMEIRSEN, E.L.M.; QUERO, C.M.; SHIELDS, R.J.; NORBEG, B.; KIME, D.E.; SCOTT, A.P. 2003. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture*, Amsterdam, 230: 547-567.