

MOTILIDADE, VIGOR E PATOLOGIAS SEMINAL *in natura* E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE *Piaractus mesopotamicus*

Danilo P. STREIT JR.¹, Ana C. de OLIVEIRA²; Ricardo P. RIBEIRO², Rodolfo N. SIROL³,
Gentil V. de MORAES², Juliana M. GALO²; Melanie DIGMAYER²

RESUMO

Avaliaram-se as alterações morfológicas dos espermatozoides de onze pacus (*Piaractus mesopotamicus*) pós congelamento do sêmen. O processo de criopreservação provocou redução ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides normais de 40,21% para 31,10% em relação ao sêmen *in natura*. Já o percentual de espermatozoides com patologias primárias aumentou ($P < 0,05$) em 14,46% no sêmen pós congelamento. Porém, não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) entre as patologias secundárias na análise do sêmen *in natura* e pós congelamento. A motilidade progressiva foi reduzida ($P < 0,05$) em 66,45% no sêmen descongelado e o vigor espermático, em 34,20% ($P < 0,05$). A anormalidade de cauda dobrada aumentou ($P < 0,05$) em 65,00% no sêmen avaliado pós congelamento, assim como a patologia “cauda quebrada”, em 41,25%. Macrocefalia e gota citoplasmática distal foram observadas apenas no sêmen pós congelamento e espermatozoides com cauda curta, somente no sêmen *in natura*. Destaca-se também que cauda solta foi encontrada em maior quantidade no sêmen *in natura*.

Palavras-chave: Criopreservação; morfologia espermática; motilidade progressiva; peixe; vigor espermático

MOTILITY, VIGOR AND PATHOLOGIES *in fresh* AND CRYOPRESERVED SEMEN OF *Piaractus mesopotamicus*

ABSTRACT

Spermatozoa morphological alterations of eleven pacus (*Piaractus mesopotamicus*) were evaluated before and after frozen-thawed processing. The semen cryopreservation caused a decrease ($P < 0.05$) in the percentage of normal spermatozoa compared to fresh semen, from 40.21% to 31.10%. Otherwise, the percentage of spermatozoa with primary pathologies increased in 14.46% ($P < 0.05$) in the semen after thawing. However, there was no differences in seminal secondary pathologies ($P > 0.05$) before and after cryopreservation. The progressive motility and the spermatic vigor were reduced in frozen-thawed semen in 66.45 and 34.2%, respectively ($P < 0.05$). Moreover, bent tail abnormality and broken tail pathology were increased in 65.00 and 41.25% ($P < 0.05$) after frozen-thawed. Also, macrocephaly and distal cytoplasmic drop were observed in the semen only after freezing while short tail spermatozoa were observed only in fresh semen. However, a higher occurrence of loose tail was observed in fresh semen.

Key words: Cryopreservation; spermatic morphology; progressive motility; fish; spermatic vigor

Artigo Científico: Recebido em: 12/11/2007 - Aprovado em: 29/05/2009

¹ Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Dep. de Zootecnia, Laboratório de Aquicultura. Av. Bento Gonçalves, 7712 - CEP: 91540-000 - Porto Alegre - RS. e-mail: danilo.streit@ufrgs.br

² Universidade Estadual de Maringá (UEM), Dep. de Zootecnia, Laboratório de Reprodução Animal. Av. Colombo, 5790 - CEP: 87020-900 - Maringá - PR. e-mail: rpribeiro@uem.br, gomoraes@uem.br

³ Gerência de Meio Ambiente da DUKE ENERGY - Geração Paranapanema S.A. Rodovia Chavantes. Ribeirão Claro, Km 10 - CEP: 18970-000 - Chavantes - SP. e-mail: rnsirol@duke-energy.com

INTRODUÇÃO

A busca por técnicas cada vez mais apuradas de preservação de sêmen de peixes vem ao encontro às questões econômicas e ecológicas atuais, sejam elas em programas de melhoramento genético ou de conservação da biodiversidade.

Neste sentido, a morfologia das células espermáticas é um fator importante na avaliação da qualidade do sêmen, sendo que o aumento das patologias espermáticas provoca diminuição na motilidade e no vigor espermático (LAHNSTEINER et al., 1998; COSSON et al., 1999). A congelamento e a posterior descongelamento provocam extensos danos aos espermatozoides (RANA, 1995). Após a criopreservação, problemas de integridade e alteração no protoplasma da célula afetam a capacidade do espermatozoide em fecundar o ovócito (BAULNY et al., 1997). Deste modo, CHAO e LIAO (2001) mostraram que a eficiência da solução crioprotetora depende do lábil balanço entre sua toxidez e a sua capacidade de proteger as células das injúrias causadas pela congelamento.

Dentre as espécies nativas brasileiras, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) destaca-se por ser uma espécie reofílica de grande importância para a pesca extrativa e por outras qualidades, como o excelente sabor da sua carne, boa capacidade para ganho de peso, adaptabilidade e rusticidade no cultivo, facilidade na obtenção de larvas através da reprodução induzida e hábito onívoro (CASTAGNOLLI, 1992; FURUYA, 2001).

Os primeiros estudos com criopresevação com sêmen de *P. mesopotamicus*, se limitaram a avaliar a motilidade progressiva (CAROLSFELD et al., 1990) e a taxa de fertilização (SILVEIRA et al., 1990). Posteriormente, BEDORE (1999), além da motilidade progressiva, avaliou a concentração de espermatozoides, mas não a correlacionou com a qualidade do processo de congelamento. Por último, STREIT Jr. et al. (2006) realizaram análise espermática completa pós-congelamento, mas não compararam com o sêmen fresco.

A composição do meio diluidor é de fundamental importância a fim de garantir a manutenção das células espermáticas de peixes durante a criopreservação (TAN-FERMIN et al. 1999). Assim, CAROLSFELD et al. (2003) sugeriram a utilização do meio diluidor a base de glicose e gema de ovo, associado a 10% de

dimetil-sulfóxido (DMSO), como padrão para cinco espécies de Characidae migradoras, dentre elas o *P. mesopotamicus*. O DMSO é um crioprotetor que apresenta características importantes que podem determinar a sua utilização. Por apresentar peso molecular pequeno, possui elevada permeabilidade celular (HE E WOODS III, 2003). Todavia, os autores ponderam que, ainda assim, o DMSO pode causar danos pelo choque osmótico e pela sua toxidez.

O objetivo deste estudo foi verificar a motilidade, vigor e morfologia das células espermáticas do sêmen de *P. mesopotamicus in natura* e após a sua congelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, seleção dos exemplares e coleta do sêmen

O trabalho foi desenvolvido na Estação de Hidrologia e Aqüicultura da DUKE ENERGY - Geração Paranapanema S.A. e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Durante o período reprodutivo, no mês de janeiro de 2004, do plantel de reprodutores de *P. mesopotamicus*, utilizaram-se 11 animais que apresentavam liberação de sêmen sob uma leve compressão abdominal. Os reprodutores foram induzidos à reprodução com 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peixe, em uma única dose. Após 240 unidades térmica acumulada (CECCARELLI et al., 2000), os animais foram envolvidos, um a um, em uma toalha úmida para reduzir o estresse e, em seguida, aplicou-se uma massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, colhendo-se o sêmen liberado em seringas de 10mL (BILLARD et al., 1995).

Avaliação espermática

Os tratamentos propostos no experimento foram: avaliação espermática do sêmen "in natura" e pós-descogelamento. As metodologias das análises são descritas a seguir.

- Motilidade progressiva e vigor espermático: uma fração de 0,01 mL da solução sêmen:água (1:14) foi analisada em um microscópio ótico (objetiva 40x). Foram atribuídos valores de 0% a 100% para a motilidade progressiva e de 0 a 5 pontos, para o vigor espermático, em função da movimentação dos espermatozoides.

- Concentração de espermatozoides: uma razão final de 1:1000 (sêmen:formol-salina tamponada) foi utilizada para preencher, por capilaridade, a câmara de Neubauer. Após a contagem, obteve-se o total de espermatozoides por mm³ de sêmen.

- Morfologia: para cada animal, um esfregaço do sêmen diluído em formol-salina tamponada (1:2000) foi corado pelo método de Rosa Bengala (STREIT Jr. *et al.*, 2004) e, depois de seco, levado ao microscópio, contando-se de 100 a 130 espermatozoides. Estes foram classificados como espermatozoides normais, com patologias primárias ou secundárias, classificadas de acordo com HERMAN *et al.* (1994).

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

Criopreservação

Os constituintes utilizados na formação da solução crioprotetora seguiu as recomendações de CAROLSFELD *et al.* (2003) para *P. mesopotamicus*, acrescido de 10 mL a mais de gema de ovo. Assim, a composição final consistiu de 20 mL de gema de ovo de galinha fresco, 5 g de glicose e 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), completados para 100 mL de água destilada.

O sêmen e a solução crioprotetora foram misturados na proporção de 1:3, respectivamente, resultando em uma concentração média de 24,39X10⁹ células/palhetes. Na seqüência, o material diluído foi envasado em palhetas estéreis de 0,25 mL, devidamente identificadas. As palhetas foram acondicionadas em um botijão de transporte, tipo dry-shipper, apenas com vapor de nitrogênio, à -16°C. Após 18 horas, as palhetas foram transferidas do botijão "dry shipper" para o de estoque, que continha apenas nitrogênio líquido à -196°C.

Descongelamento

Sessenta dias após a criopreservação, o sêmen foi descongelado em banho-maria, à temperatura de 45°C, por cinco segundos para, em seguida, serem analisadas a morfologia dos

espermatozoides, motilidade progressiva e o vigor espermático.

Delineamento estatístico

O delineamento do experimento foi inteiramente ao acaso, em que a amostra do sêmen de cada *P. mesopotamicus* foi avaliada "in natura" e pós-congelamento (dois tratamentos). Cada amostra de sêmen analisada foi considerada uma unidade experimental. O modelo a seguir foi utilizado para análise do sêmen pré e pós congelamento:

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

onde:

Y_{ij} = observação do animal (j) submetido ao tratamento (i);

μ = média geral;

T_i = efeito do tratamento (i);

e_{ij} = erro aleatório associado ao animal (j) submetido ao tratamento (i).

Para as análises estatísticas, utilizou-se o procedimento GENMOD do SAS (1992), que implementou a metodologia de MODELOS LINEARES GENERALIZADOS. Considerou-se que os erros possuíam distribuição de probabilidade de POISSON, com função de ligação logarítmica a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A análise do sêmen pós congelamento revelou redução ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides normais de 41,21 para 31,50% e, por conseqüência, ocorreu um aumento de 46,73 para 54,60% no percentual de espermatozoides com patologias primárias. Por outro lado, não ocorreu aumento ou redução ($P > 0,05$) no percentual de espermatozoides com patologias secundárias nos sêmen avaliados "in natura" ou pós-congelamento, correspondentes a 13,14 e 13,91%, respectivamente (Tabela 1).

Constatou-se que cauda quebrada, macrocefalia (patologias primárias), cauda dobrada e gota citoplasmática distal (patologias secundárias), aumentaram ($P < 0,05$) no sêmen avaliado pós congelamento em relação ao *in natura*. Já a patologia de cauda solta foi observada em maior quantidade ($P < 0,05$) no sêmen *in natura*. Espermatozoides com cauda curta (patologia

primária) foram registrados apenas no sêmen *in natura* (1,53%) ($P < 0,05$). Contudo, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para as patologias cabeça solta (secundária), cauda degenerada, corrugada e enrolada (primárias) no sêmen *in natura* e pós congelção. No entanto, destaca-se que o índice de espermatozoides com cauda

enrolada foi superior a 20% do total das patologias registradas, tanto no sêmen *in natura* quanto no pós congelção (Figura 1). Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas as patologias espermáticas observadas no sêmen de *P. mesopotamicus* pós congelção e identificadas a sua incidência na Figura 1.

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão de espermatozoides normais, com patologias primárias e secundárias, motilidade progressiva e vigor espermático observadas nas análises de sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) “*in natura*” e pós congelção

PARÂMETROS	TRATAMENTOS	
	“ <i>in natura</i> ”	Pós-congelção
Espermatozoides normais (%)	40,21 \pm 15,28 a	31,50 \pm 12,30 b
Espermatozoides com patologias primárias (%)	46,73 \pm 12,48 b	54,60 \pm 7,59 a
Espermatozoides com patologias secundárias (%)	13,14 \pm 6,18	13,91 \pm 6,13
Motilidade progressiva (%)	69,09 \pm 7,48 a	23,18 \pm 15,04 b
Vigor (0-5 pontos)	3,45 \pm 0,58 a	2,27 \pm 0,70 b

Médias com letra diferente, na mesma linha ($P < 0,05$)

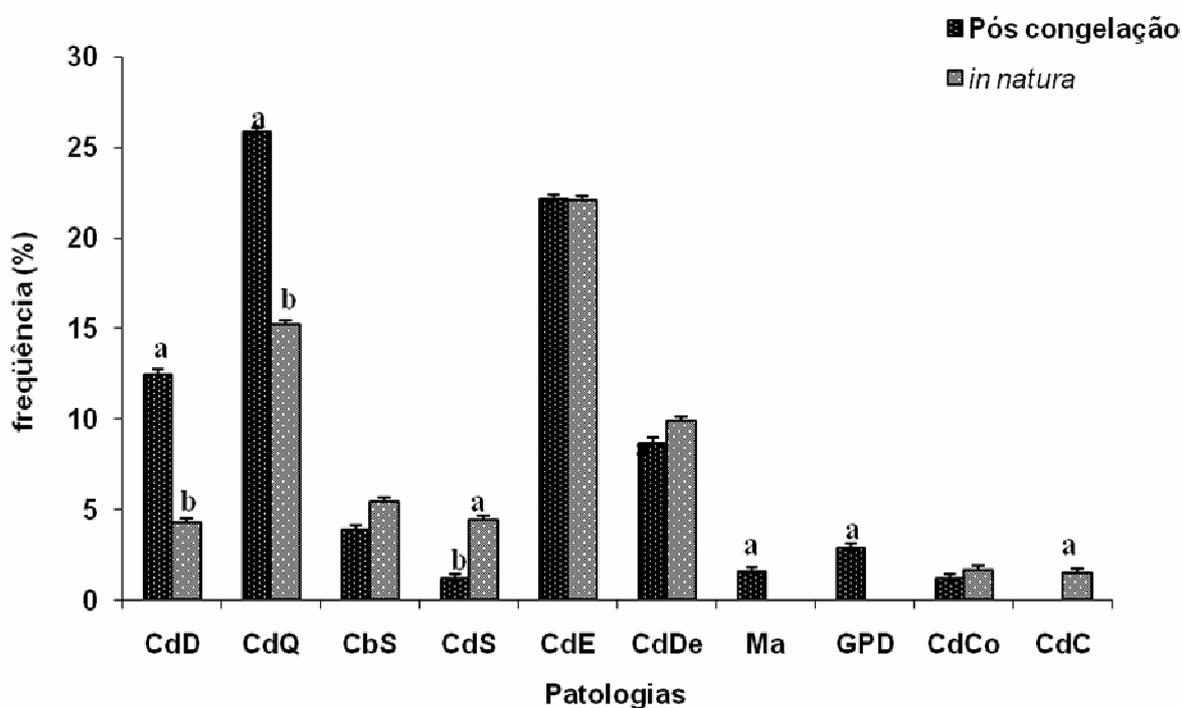


Figura 1. Percentuais médios de patologias encontradas no sêmen *in natura* e pós-congelção de *P. mesopotamicus*. Patologias observadas: cauda dobrada (CdD); cauda quebrada (CdQ); cabeça solta (CbS); cauda solta (CdS); cauda enrolada (CdE); cauda degenerada (CdDe); macrocefalia (Ma); gota citoplasmática distal (GPD); cauda corrugada (CdCo) e cauda curta (CdC). Letras diferentes entre os tratamentos $P < 0,05$

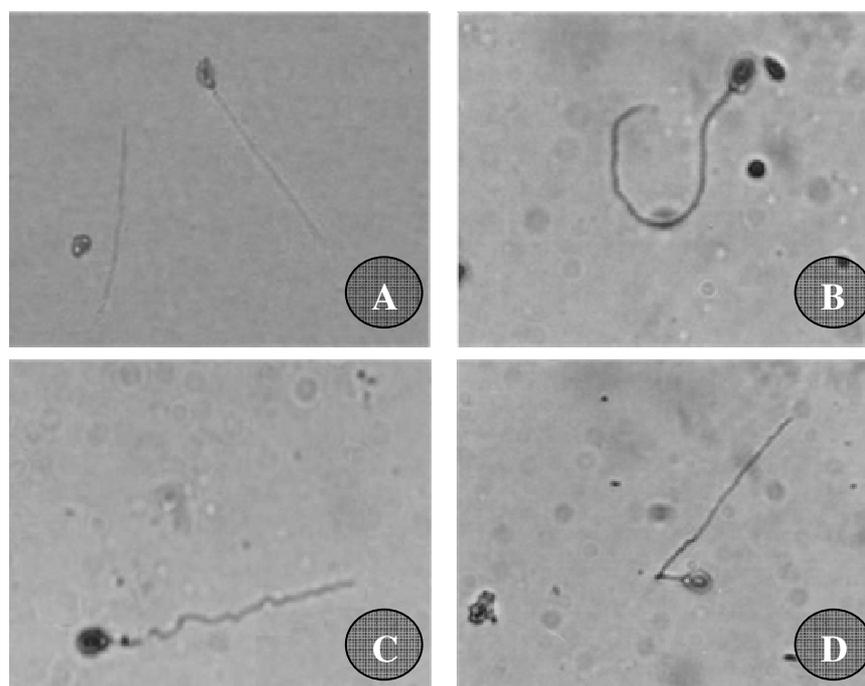


Figura 2. Ilustrações de morfologias observadas no sêmen de *P. mesopotamicus* pós congelção. (A) espermatozói­des com cauda e cabeça solta e espermatozói­de normal; (B) espermatozói­de com a cauda dobrada; (C) espermatozói­de com a cauda corrugada; (D) espermatozói­des com a cauda quebrada na peça intermediária. Microscopia ótica com objetiva de 40

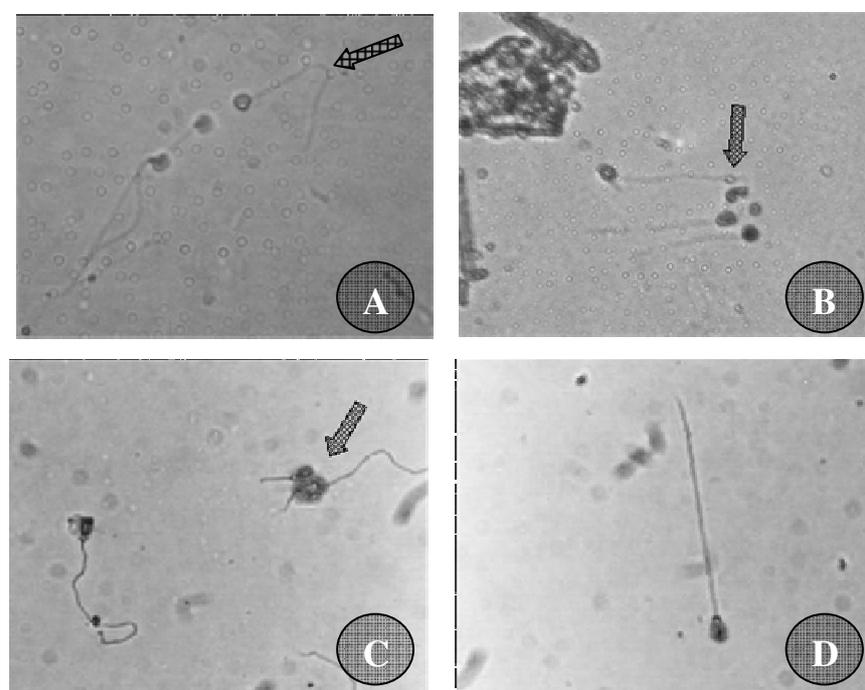


Figura 3. Ilustrações de morfologias observadas no sêmen de *P. mesopotamicus* pós congelção. (A) espermatozói­de com cauda dobrada (seta); (B) espermatozói­de com gota citoplasmática distal (seta), (C) espermatozói­de com cauda curta ao lado de outro com macrocefalia (seta) e, espermatozói­de com cauda corrugada (esquerda abaixo); (D) espermatozói­de normal. Microscopia ótica com objetiva de 40x

DISCUSSÃO

A redução do percentual de espermatozóides normais e o aumento das patologias primárias observadas nas análises do sêmen de *P. mesopotamicus* no presente trabalho, estão intimamente relacionados com os processos de criopreservação. Fato este observado por LAHNSTEINER *et al.* (1996) no sêmen descongelado de *Oncorhynchus mykiss*, que encontraram 84,0% de patologias espermáticas. Ainda com o sêmen desta mesma espécie, CABRITA *et al.* (1998) observaram não apenas um considerável acréscimo do número de espermatozóides mortos, mas também uma grande fragilidade das células espermáticas após o processo de congelamento. Uma explicação para o fato do aumento de patologias pós congelamento pode estar na afirmação de FABBROCINI *et al.* (2000), que relacionam a toxidez dos crioprotetores e a ineficiência no processo de criopreservação como os principais responsáveis pelas crio-injúrias, que são provocadas nas células espermáticas.

O elevado percentual de patologias após o processo de criopreservação era, de certo modo, esperado. Entretanto, também ocorreu um aumento de espermatozóides com patologias primárias no sêmen pós congelamento. Em mamíferos, por exemplo, HERMAN *et al.* (1994) citam que as patologias primárias estão relacionadas à espermatogênese e as patologias secundárias, com fatores ambientais e de manejo dos reprodutores, muito embora, em ratos, a falta de selênio levou ao surgimento de espermatozóides com a cauda quebrada na peça intermediária (WU *et al.*, 1979). As alterações espermáticas encontradas por LAHNSTEINER *et al.* (1996) em espermatozóides de *Oncorhynchus mykiss* pós congelamento foram edemas na cabeça, peça intermediária e diferentes regiões da cauda. No presente estudo, o aumento da ocorrência de espermatozóides com patologias primárias, pós congelamento, pode estar relacionado com algum processo durante a criopreservação, como a exposição à solução crioprotetora (choque osmótico), com o crioprotetor utilizado no processo (DMSO), tempo em que o espermatozóide ficou exposto à solução crioprotetora antes de ser submetido ao

resfriamento (equilíbrio tempo:solução), com a curva de resfriamento e o processo de congelamento.

Apesar de ser observada a existência de macrocefalia no sêmen pós congelamento, predominaram as patologias de cauda, especialmente dobrada e quebrada. Estas alterações morfológicas, de acordo com KAVAMOTO *et al.* (1999), provocam movimentos circulares e oscilatórios dos espermatozóides, o que leva, por exemplo, à redução da taxa de fertilização. De todo modo, a cauda ou a cabeça dos espermatozóides apresentam vulnerabilidade diferente em cada espécie, como sugeriu TADDEI *et al.* (2001) ao verificarem, em *Diplodus puntazzo*, mais injúrias na cabeça, diferente do que ocorreu, neste trabalho, com o *P. mesopotamicus*. O edema e posterior ruptura da cauda dos espermatozóides de *Oncorhynchus mykiss*, reportada por LAHNSTEINER *et al.* (1996) levou os autores a relacionar a patologia à formação de cristais de gelo intracelular.

A macrocefalia, por ser patologia classificada como primária, possivelmente deveria estar presente também no sêmen *in natura*. Entretanto, observou-se a sua presença somente pós congelamento do sêmen, que pode ter motivado o surgimento desta patologia pela ação do processo de congelamento. Lesões na cabeça do espermatozóide, como edemas, relatado por COSSON *et al.* (1999), estão relacionadas a um meio hiposmótico, em que a osmolaridade do meio diluidor é a principal responsável pelas injúrias provocadas nas caudas e na cabeça dos espermatozóides. Então, pode-se supor que a macrocefalia tenha surgido devido a um possível choque osmótico atribuído ao diluidor utilizado neste trabalho, embora não tenha sido verificada sua osmolaridade.

O principal prejuízo causado pelas injúrias que os espermatozóides de peixes sofrem devido à congelamento está relacionado à redução da motilidade e do vigor espermático e, por conseqüência, à redução na capacidade de fertilização (LAHNSTEINER *et al.*, 1996b; LAHNSTEINER *et al.*, 1998; COSSON *et al.*, 1999). Deste modo, pode-se supor que a redução da motilidade progressiva de 69,09 % para 23,18 %, e do vigor espermático de 3,45 para 2,27 pontos, possa, em parte, estar relacionado ao aumento de

anormalidades morfológicas primárias e secundárias em decorrência do processo relacionado à criopreservação. O resultado da motilidade progressiva obtido no sêmen pós congelamento assemelhou-se aos 20,00 % encontrado por SILVEIRA *et al.* (1990) na mesma espécie, embora tenha partido de uma motilidade de 90,00% no sêmen *in natura*. A queda acentuada da motilidade progressiva no sêmen descongelado necessariamente não é uma prerrogativa para falta de capacidade fertilizante dos espermatozoides. Usando sêmen pós congelamento de 20 e 30% de motilidade de "sharp-tooth catfish", URBÁNYI *et al.* (2000) não observaram diferença na taxa de fertilização em relação ao sêmen com motilidade entre 90 e 100% usado *in natura*. Por outro lado, a fertilização de ovócitos de *Xyrauchen texanus* variou de 35 a 18% após a motilidade progressiva cair de 50,00 para 18,00% (TIERSCH *et al.*, 2000). Para YAO *et al.* (2000), a queda da motilidade de espermatozoides *Macrozarces americanus* está relacionada com o processo de congelamento e posterior descongelamento, que produz severo inchaço nas mitocôndrias ou uma desidratação do citoplasma da peça intermediária do espermatozoide. De acordo com os autores, esta alteração na atividade das mitocôndrias gera redução no suplemento energético da célula espermática, o que reduz no batimento flagelar e a conseqüente perda da motilidade.

CONCLUSÃO

O processo de congelamento do sêmen de *P. mesopotamicus* reduziu o percentual de espermatozoides normais, a motilidade e o vigor espermático, além de ter elevado o percentual de espermatozoides com patologias primárias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Empresa DUKE ENERGY INTERNATIONAL - Geração Paranapanema - S.A. pela parceria e apoio no desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

BAULNY, B.O.; LE VERN, Y.; KERBOUEUF, D.; MAISSE, G. 1997 Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane

integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*, San Diego, 34(2): 141-149.

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

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. 1995 Broodstock management and seed quality-General considerations. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science, p.1-24.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRAÉZ, M.P. 1998 Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, Amsterdam, 201(3-4): 301-314.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RAMOS, S.M.; SILVEIRA, A.N. 1990 Criopreservação do sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1987. *Boletim Técnico do CEPTA*, Pirassununga, 3(único): 1-4.

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(2): 472-489.

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

CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G. 2000 *Dicas em piscicultura; perguntas e respostas*. Botucatu: Santina Gráfica Editora, 247p.

CHAO, N.H. e LIAO, I.C. 2001 Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, Amsterdam, 197(1): 161-189.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. 1999 Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. *The male gamete: from basic*

- science to clinical applications. Viena: Cache River Press, p.162-186.
- FABBROCINI, A.; LAVADERA, S.L.; RISPOLI, S.; SANSONE, G. 2000 Criopreservação de seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, San Diego, 40(10): 46-53.
- FURUYA, W.M. 2001 Espécies nativas. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. *Fundamentos de Aqüicultura*. Canoas: Editora da Ulbra, p.83-90.
- HE, S. e WOODS III, L.C. 2003 Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*, San Diego, 46(1): 17-25.
- HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. 1994 *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. Illinois: Interstate Publishers, 382p.
- KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S.; TALMELLI, E.F.A. 1999 Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 25(único): 61-66.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. 1996 Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *The Progressive Fish-Culturist*, Bethesda, 58(3): 149-156.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. 1998 Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, Amsterdam, 163(1-2): 163-181.
- RANA, K. 1995 Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science, p.53-75.
- 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): 1-13.
- SIROL, R.N. e BRITTO, S.G. 2005 Conservação e manejo da ictiofauna: Repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. *Ecologia de reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*. São Carlos: RIMA Editora, p.275-284.
- SORENSEN Jr., A.M. 1979 *A laboratory for animal reproduction*. 4ªed. Massachusetts: American Press, 154p.
- STREIT Jr., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. 2004 Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, 7(2): 157-162.
- STREIT Jr. D.P.; BENITES, C.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; CALDIERI, R.F. 2006 Sêmen de pacu (*piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, 7(3): 289-297.
- TADDEI, A. R.; BARBATO, F.; ABELLI, L.; CANESE, S.; MORETTI, F.; RANA, K.J.; FAUSTO, A.M.; MAZZINI, M. 2001 Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefrozen, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology*, San Diego, 42(4): 244-255.
- TAN-FERMIN, J.D.; MIURA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. 1999 Seminal plasma composition, sperm motility, milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther). *Aquaculture*, Amsterdam, 171(3-4): 323-338.
- TIERSCH, T.R.; FIGIEL Jr., C.R.; WAYMAN, W.R.; WILLIAMSON, J.H.; CARMICHAEL, G.J.; GORMAN, G.G. 2000 Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p.117-122.

- URBÁNYI, B.; DINNYÉS, A.; MAGYARY, I. 2000 Cryopreservation methods for sperm of the sharptooth catfish. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p.286-287.
- YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G.F.; EMERSON, C.J. 2000 Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, Amsterdam, 181(3-4): 361-375.
- WU, A.S.H.; OLDFIELD, J.E.; SHULL, L.R.; CHEEKE, P.R. 1979 Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. *Biology of Reproduction*, Champaign, 20(4): 793-798.