



Parâmetros seminais de reprodutores de *Pseudoplatystoma reticulatum*, em cativeiro, pré e pós-indução hormonal

Seminal parameters of Pseudoplatystoma reticulatum farmed broodstock pre and post-hormonal induction

D.P. Streit Jr^{1,5}, R.N. Sirol², R.P. Ribeiro³, M. Digmayer³, J.M. Galo³, G.V. Moraes³, J.A. Povh⁴

¹Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Gerente Ambiental da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL), Campinas, SP, Brasil.

³Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

⁴Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Rondonópolis, MT, Brasil.

⁵Correspondência: danilo.streit@ufrgs.br

Resumo

Foi avaliada a qualidade seminal, pré e pós-indução hormonal de 13 animais. A indução hormonal provocou aumento ($P < 0,05$) da motilidade progressiva, não alterou o vigor espermático e reduziu ($P < 0,05$) a concentração de espermatozoides do *P. reticulatum*. O percentual de espermatozoides normais não se alterou ($P > 0,05$) após a indução hormonal, mas reduziu ($P < 0,05$) as anormalidades primárias no sêmen. As anormalidades secundárias foram mais incidentes ($P < 0,05$) após a indução hormonal. As morfopatologias cabeça e cauda solta e curta aumentaram ($P > 0,05$) no sêmen obtido após a indução hormonal. Entretanto, cauda enrolada incidiu em maior número ($P > 0,05$) no sêmen dos animais pré-indução hormonal. Houve ganho qualitativo do sêmen, porém com sensível perda quantitativa.

Palavras-chave: espermatozoide, patologia, peixe.

Abstract

The semen quality was assessed in 13 fish, pre and post-hormonal induction. The hormonal induction procedure was responsible for increasing the seminal progressive motility ($P < 0.05$), it did not affect the spermatic vigor, and decreased ($P < 0.05$) the concentration of spermatozoa in *P. reticulatum*. The percentage of normal spermatozoa did not change ($P > 0.05$) after hormonal induction, however a decrease ($P < 0.05$) in semen primary abnormalities was recorded. Secondary abnormalities were found more frequently ($P < 0.05$) after hormonal induction. Head morphopathologies, short and free-tail index increased ($P > 0.05$) in the semen after hormonal induction. However, the rolled tail index was higher ($P > 0.05$) in the semen pre hormonal induction. There was a gain in semen quality, but with a slight loss in quantity.

Keywords: pathology, fish, spermatozoon.

Introdução

O surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*) mostra inúmeros atributos zootécnicos favoráveis para seu cultivo em larga escala, entre eles a textura firme da carne e a ausência do sabor acentuado de peixe e de espinhos intramusculares (Campos, 2003). O cultivo da espécie encontra-se em expansão, especialmente no estado do Mato Grosso do Sul. Este sucesso deve-se, sobretudo, aos avanços no conhecimento, em especial nas áreas de manejo reprodutivo e nutricional (Campos, 2005).

A reprodução em cativeiro do *P. reticulatum* deixou de ser um fator limitante, iniciando-se a produção em escala de alevinagem há pouco menos de duas décadas (Sato et al., 1997). A obtenção de gametas de *P. reticulatum* ocorre, como em outras espécies migradoras no Brasil, por indução hormonal, extrusão de gametas e posterior fertilização, sendo o extrato hipofisário de carpa utilizado, geralmente, como hormônio indutor (Campos, 2005).

O conhecimento da biologia da espécie a ser utilizada com vistas à produção é o primeiro passo para o sucesso em escala comercial. Informações a respeito da biologia reprodutiva são de extrema valia para se obter um conhecimento básico da espécie-alvo (Romagosa et al., 2003), pois a produção adequada de sementes (alevinos) é fundamental para o estabelecimento de uma cadeia de produção. Sabe-se que o *P. reticulatum* é uma espécie considerada grande migradora e que necessita deslocar-se rio acima para liberar seus gametas e propagar-se na natureza (Vazzoler, 1996). Logo, em cativeiro, a indução hormonal reprodutiva é fundamental para a liberação de gametas e consequente produção de alevinos.

Muito embora os estudos de qualidades seminais sejam recentes no Brasil se forem comparados com os de outras espécies, observações como a de Beirão et al. (2009) são pertinentes. Isso porque, de acordo com os autores, a qualidade espermática parece ser uma das razões para a ineficiência enfrentada na reprodução em

cativeiro de algumas espécies de peixes. E pode ser reforçada pela citação de Rurangwa et al. (2004), os quais afirmam que, em cultivo comercial, o sêmen é frequentemente inadequado em termos de qualidade e quantidade e nem sempre tem apresentado sucesso na fertilização, além do processo de inseminação artificial comumente utilizado nas espécies aquáticas. Os parâmetros quali-quantitativos do sêmen de espécies nativas brasileiras vêm sendo estudados, como: curimbatá (*Prochilodus lineatus*; Kavamoto et al., 1999); jundiá (*Rhamdia quelen*; Ferreira et al., 2001); piabanha (*Brycon insignis*; Andrade-Talmelli et al., 2001); suruvi (*Steindachneridion scripta*; Luz et al., 2001); pirapitinga do sul (*Brycon opalinus*; Narahara et al., 2002); pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Streit Jr. et al., 2006). Porém, não são registrados estudos relativos à qualidade seminal dos reprodutores de *P. reticulatum* utilizados em cativeiro.

A importância do *P. reticulatum* pode ser constatada pelo crescimento na sua produção nos últimos anos, como de 2003 para 2004, 38% no Mato Grosso do Sul, chegando a 189% em São Paulo, mesmo que atualmente represente uma pequena parcela na produção em cativeiro no Brasil, menos de 1% (Ostrensky et al., 2008). Por outro lado, a produção do *P. reticulatum* está relacionada a um mercado diferenciado no Brasil, nicho de carnes nobres com valor mais elevado, assim como a exportação para a Europa, que fundamentalmente está relacionado com as excelentes características organolépticas da sua carne.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade seminal de reprodutores de *P. reticulatum*, mantidos em cativeiro, pré e pós-indução hormonal, com extrato de hipófise de carpa.

Material e Métodos

Local de execução

O trabalho foi realizado no Laboratório de Hidrologia e Aqüicultura da Duke Energy do Brasil e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Obtenção do sêmen

Para avaliação seminal dos reprodutores, foram selecionados 13 animais com características reprodutivas secundárias (liberação de sêmen, sob uma leve compressão no sentido cefalocaudal durante o período reprodutivo, capturados em um tanque onde estavam alocados (1000 m²) com auxílio de rede de arrasto. No laboratório, os animais foram pesados e identificados pelo número do *microchip*.

Para obtenção do sêmen, tanto pré como pós-indução hormonal, utilizou-se uma seringa graduada de 3 mL para cada animal, alocada à porta do orifício urogenital, seco com toalha de papel macio, evitando-se a contaminação por água, urina ou fezes (Billard et al., 1995). Um volume de 0,2 mL de sêmen foi colhido para a avaliação pré-indução hormonal, suficiente para análise dos parâmetros seminais. Após este procedimento, os animais foram induzidos com 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peixe e imediatamente transferidos para aquários de 2000 L com fêmeas (2 machos:1 fêmea).

Estabeleceram-se 255 unidades térmicas acumuladas (UTA; Ceccarelli et al., 2000) para a colheita do sêmen pós-indução hormonal, sendo que a temperatura média da água no aquário era de 27,2 ± 0,3°C. O mesmo procedimento para a colheita do sêmen foi aplicado no instante pós-indução.

Análise seminal

Imediatamente após a colheita do sêmen de cada animal, analisaram-se a motilidade progressiva, o vigor espermático, a concentração espermática e a morfologia dos espermatozoides, com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 40X (Maria et al., 2010).

As análises estão descritas a seguir:

Motilidade progressiva e vigor espermático: o sêmen coletado foi diluído em água destilada (20:200 µL), e 2 µL deste foram acondicionados em uma lâmina e preparados para observação em microscopia de luz. Atribuíram-se 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: 2 µL de sêmen foram diluídos com uma pipeta de precisão em 10 mL de solução salina de formol tamponado, na qual se procedeu à contagem das células espermáticas em câmara de Neubauer.

Morfologia dos espermatozoides: uma extensão foi produzida para cada animal, pré e pós-indução hormonal, a partir da diluição do sêmen em solução salina de formol tamponado (1:2000, respectivamente). Esta foi corada pelo método de Conn (1918), utilizando-se como corante o rosa bengala. Após corada e seca, foram realizadas a contagem de 100 espermatozoides e a identificação das morfopatologias primárias e secundárias, de acordo com Herman et al. (1994).

As morfopatologias primárias avaliadas foram: cauda quebrada, enrolada, curta e abaxial, micro e macrocefalia. Entretanto, cabeça solta, cauda dobrada, solta e corrugada foram as morfopatologias secundárias avaliadas.

Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, na avaliação do sêmen de *P. reticulatum* 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 (T).

Para as análises estatísticas, utilizou-se o procedimento GENMOD do SAS, Release 6.07, 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

A indução hormonal provocou um aumento ($P < 0,05$) do valor médio da motilidade progressiva do *P. reticulatum*. Todavia, o valor médio do vigor espermático não sofreu alteração ($P > 0,05$) após a indução hormonal. Quanto à concentração de espermatozoides/mL de sêmen, ocorreu uma redução significativa ($P < 0,05$) no valor médio após a indução hormonal (Tab. 1).

Para a morfopatologia espermática, não houve diferença ($P > 0,05$) entre o percentual de espermatozoides normais em ambas as condições (pré e pós-indução). Por outro lado, o sêmen dos reprodutores avaliados antes da indução hormonal apresentou um percentual de espermatozoides com anormalidades primárias superior ao sêmen colhido após a indução ($P < 0,05$). Com relação às anormalidades secundárias, houve maior incidência ($P < 0,05$) no sêmen obtido após a indução hormonal (Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros seminais de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*) avaliados pré e pós-indução hormonal com extrato de hipófise de carpa.

Parâmetros	Indução com extrato de hipófise	
	Pré	Pós
Motilidade espermática (%)	63,84b	71,15a
Vigor espermático (1 a 5 pontos)	2,3	2,76
Concentração de espermatozoides (esp./mL)	2,01X10 ⁹ a	1,00 X10 ⁹ b
Espermatozoides normais (%)	54,57	52,73
Espermatozoides com patologias primárias (%)	35,93a	28,87b
Espermatozoides com patologias secundárias (%)	11,32b	16,55a

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

As morfopatologias cabeça e cauda solta e curta foram registradas com maior incidência ($P > 0,05$) no sêmen obtido após a indução hormonal. Entretanto, as morfopatologias cauda enrolada e microcefalia foram mais incidentes ($P > 0,05$) no sêmen dos animais pré-indução hormonal. Quanto às morfopatologias cauda dobrada, enrolada, abaxial, corrugada, micro e macrocefalia, não ocorreu diferença percentual correspondente à origem do sêmen, se pré ou pós-indução (Fig. 1).

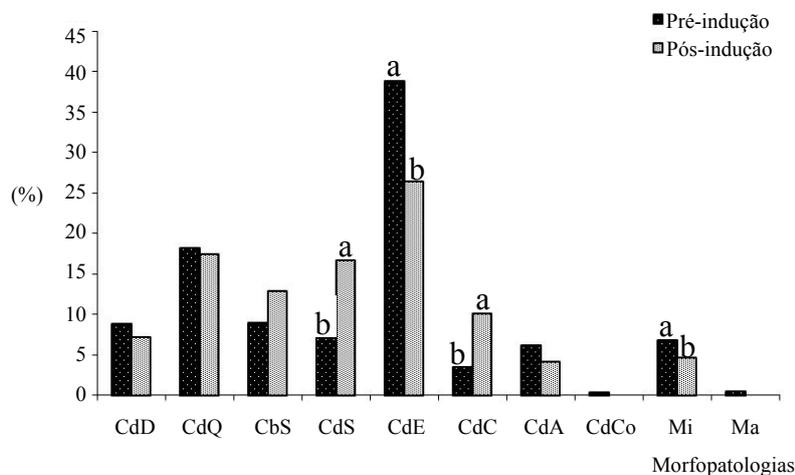


Figura 1. Frequência das morfopatologias espermáticas verificadas nos sêmens de *Pseudoplatystoma reticulatum*, obtidos pré e pós-indução hormonal. Cauda dobrada (CdD), cauda quebrada (CdQ), cabeça solta (CbS), cauda solta (CdS), cauda enrolada (CdE), cauda curta (CdC), cauda abaxial (CdA), cauda corrugada (CdCo), microcefalia (Mi) e macrocefalia (Ma). Letras diferentes entre um par de barras ($P > 0,05$).

Discussão

Os valores dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen podem ou não ser alterados após a indução hormonal. No presente trabalho, a motilidade espermática foi sensivelmente alterada após o estímulo com o extrato hipofisário, condição também observada para outra espécie de *Pimelodidae*, *R. quelen*, por Ferreira et al. (2001). Estes mesmos autores encontraram motilidade pré e pós-indução hormonal de 72,5 e 88,2%, respectivamente. Entretanto, a característica de aumento da motilidade pós-indução não é recorrente para todas as espécies migradoras. A motilidade espermática de piavuçu (*Leporinus elongatus*), registrada por Streit Jr. et al. (2008b), foi significativamente inferior após a indução hormonal, de 36,72% contra 53,72% pré-indução. De todo modo, para Clearwater e Crim (1998), a motilidade espermática pode aumentar ou diminuir com a indução hormonal. Porém, os autores completam que as espécies sempre sofrerão com mudanças no metabolismo da progesterona, sendo este, portanto, dependente da ação dos hormônios gonadais existente no extrato hipofisário.

Neste contexto, o vigor espermático está diretamente associado à motilidade progressiva, acompanhando sua tendência, seja de aumento ou redução após a indução hormonal, muito embora tenha sido observado um aumento do vigor espermático no sêmen de *P. reticulatum* após a indução hormonal, porém insuficiente para este diferir estatisticamente do sêmen avaliado antes da indução. Os valores do vigor espermático com relação à motilidade progressiva também foram observados no sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) analisado por Streit Jr. et al. (2008a), pré e pós-indução hormonal, assim como a avaliação do sêmen de *L. elongatus*, reportada por Streit Jr. et al. (2008b), muito embora os autores tenham encontrado uma redução nos valores de motilidade progressiva e vigor espermático após a indução.

A redução da concentração de espermatozoides após a indução hormonal, em geral, ocorre para as espécies migradoras. Porém, com *P. reticulatum*, a concentração caiu em mais de 50%, quando comparado a *S. maxillosus*, em que a redução da concentração, em média, não passou de 20% (Streit Jr. et al., 2008a). Em outra espécie migradora, piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), também foi registrada a redução da concentração espermática após a indução hormonal, mas Bedore (1999) observou apenas 29%.

Outro fato que reforça esta característica de redução da concentração de espermatozoides no sêmen de *P. reticulatum* é o aumento da fluidez seminal após a indução hormonal, muito embora não tenha sido mensurado o volume médio do sêmen colhido dos reprodutores. Este fato corrobora o reportado por Saad e Billard (1987), em que o estímulo provocado pela ação hormonal do indutor aumentou o fluido seminal e, consequentemente, diluiu a concentração de espermatozoides.

A relação ótima entre número de espermatozoides e oócitos é relativa para cada espécie. Por exemplo, se para o dourado (*Salminus brasiliensis*) esta relação está em 30.772 espermatozoides:1 oócito, de acordo com Sanches et al. (2009), com *R. quelen* este número é menor, 9.000 espermatozoides:1 oócito, segundo Bombardelli et al. (2006), e de 314.418 espermatozoides:1 oócito quando a espécie é o *B. insignis* (Shimoda et al., 2007). Sendo assim, é impossível afirmar se a redução na concentração espermática provocada após a indução hormonal do *P. reticulatum* no presente estudo foi o suficiente para produzir uma redução qualitativa a ponto de reduzir uma taxa de fertilização.

A origem das morfopatologias espermáticas está diretamente relacionada aos tipos de anormalidades identificadas (Herman et al., 1994), o que, neste caso, relaciona-se à severidade dela. Muito embora, sob o ponto de vista da indução hormonal, o percentual de espermatozoides normais não tenha se alterado, as morfopatologias primárias foram significativamente mais elevadas antes da indução hormonal. Uma hipótese sugerida para este fato pode estar relacionada com a ação de hormônios gonadotrópicos existentes no extrato hipofisário utilizado, que pode ter provocado a maturação final dos espermatozoides, reduzindo, portanto, o percentual de morfopatologias primárias no sêmen após a indução hormonal.

Quanto às morfopatologias secundárias, registradas em maior percentual no sêmen pós-indução hormonal, a manipulação para a obtenção do sêmen parece ser a mais plausível. Se para avaliação do sêmen pré-indução hormonal um pequeno volume de sêmen foi coletado, após a indução, o volume foi maior, produzindo grande pressão nos testículos. Por consequência, esta ação mecânica pode ter gerado um aumento na quantidade de espermatozoides ainda imaturos, assim como os defeitos. A explicação para a grande quantidade de sêmen coletado após a indução hormonal foi sua utilização na fertilização dos óvulos.

Quanto a estas morfopatologias espermáticas serem fundamentalmente determinantes para redução da taxa de fertilização dos óvulos, ainda é uma incógnita. Em mamíferos, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) recomenda não utilizar sêmen com índices de morfopatologias espermáticas acima de 30%, em bovinos e equinos, e de 20%, em ovinos e suínos. Em peixes, suspeita-se que este percentual seja mais alto, em razão de a concentração espermática ser mais elevada que nas espécies terrestres. Por exemplo, em touro, a concentração espermática varia de 0,8 - 2 x 10⁹ espermatozoides/mL e em garanhão de 0,15 - 0,3x10⁹ espermatozoides/mL (Hafez e Hafez, 2000), enquanto em peixes migradores este valor dificilmente é inferior a 1 x 10⁹; para citar alguns: piapara (*Leporinus obtusidens*), 16x10⁹ espermatozoides/mL (Murgas et al., 1999), *B. orbignyanus*, 5,4 x 10⁹ espermatozoides/mL (Maria et al., 2006) e *S. maxillosus*, 15,92x10⁹ espermatozoides/mL (Streit Jr. et al., 2008a). Quanto ao *P. reticulatum*, pós-indução hormonal, a concentração espermática ficou em 1 x 10⁹ espermatozoides/mL, e as morfopatologias um pouco mais de 47%.



Deste modo, a análise dos parâmetros seminais parece ser crucial para determinar a qualidade do sêmen a ser utilizado, seja *in natura* ou criopreservado. Isso implica estabelecer uma análise conjunta dos parâmetros quali-quantitativos, e não isoladamente.

Conclusão

Após a indução hormonal, ocorreu acréscimo nos parâmetros qualitativos (motilidade e redução do percentual de patologias primárias) do sêmen de *P. reticulatum*, porém com sensível redução do parâmetro quantitativo de concentração espermática.

Referências

- Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Romagosa E, Verani NF.** Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). Bol Inst Pesca, v.27, p.21-28, 2001.
- Bedore AG.** Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* e de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*. 1999. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, 1999.
- Beirão J, Soares F, Herraez MP, Dinis MT, Cabrita E.** Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. Theriogenology, v.72, p.1251-1261, 2009.
- Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M.** Broodstock management and seed quality-General considerations. In: Bromage N, Roberts RJ. (Ed.). Broodstock management and egg larval quality. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.1-24.
- Bombardelli RA, Mörschbacher, EF, Campagnolo R., Sanches EA, Syperrek MA.** Dose inseminante para a fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Rev Bras Zootec, v.35, p.1251-1257, 2006.
- Campos JL.** O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829). In: Baldisserotto B, Gomes LC (Ed.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, RS: Ed. UFSM, 2005. p.303-319.
- Campos JL.** The culture of pintado, *Pseudoplatystoma spp* (Pimelodidae). In: The World Aquaculture Society, 2003, Salvador, BA. Anais... Salvador: WAS, 2003. p.150. Resumo.
- Ceccarelli OS, Senhorini JA, Volpato G.** Dicas em piscicultura: perguntas e respostas. Botucatu: Santina Gráfica Editora, 2000. 247p.
- Clearwater SJ, Crim LW.** Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. Fish Physiol Biochem, v.19, p.249-257, 1998.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA.1998. 49p.
- Conn HJ.** The microscopic study of bacteria and fungi in soil. NY Agr Exp Sta Tech Bull, n.64, p.3-20, 1918.
- Ferreira AA, Nuñez APO, Luz RK, Tataje DAR, Esquivel JR, Restrepo JB.** Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen do jundiá *Rhamdia quelen*. Bol Inst Pesca, v.27, p.57-60, 2001.
- Hafez ESE, Hafez B (Ed.).** Reproduction in farm animals. Philadelphia: Lippicott Williams e Wickins, 2000. 509p.
- Herman HA, Mitchell JR, Doak GA (Ed.).** The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Champaign, IL: Interstate, 1994. 392p.
- Kavamoto ET, Barnabe VH, Campos BES, Andrade-Talmelli EF.** Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). Bol Inst Pesca, v.25, p.61-66, 1999.
- Luz RK, Salaro AL, Souto EF.** Desenvolvimento de alevinos de trairão com dietas artificiais em tanques de cultivo. Rev Bras Zootec, v.30, p.1159-1163, 2001.
- Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Silva CA, Carneiro PCF.** Sêmen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. J Appl Ichthyol, v.26, p.779-783, 2010.
- Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV.** Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture, v.260, p.298-306, 2006.
- Murgas LDS, Silva MOB, Mello CBM, Kabeya DM, Santana GM.** Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). Rev Bras Reprod Anim, v.23, p.246-248, 1999.
- Narahara MY, Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Godinho HN.** Reprodução induzida da pirapitinga-dosul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. Rev Bras Zootec, v.31, p.1070-1075, 2002.
- Ostrensky A, Borghetti JR, Soto D.** Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer. Brasília, DF:FAO, 2008. 276p.
- Romagosa E, Paiva P, Andrade-Talmelli EF, Godinho HM.** Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. Bol Inst Pesca, v.29,



p.151-159, 2003.

Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v.234, p.1-28, 2004.

Saad A, Billard R. Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, v.65, p.67-77, 1987.

Sanches EA, Bombardelli RA, Baggio DM, Souza BE. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. *Rev Bras Zootec*, v.38, p.2091-2098, 2009.

Sato Y, Cardoso EL, Sallum WB, Godinho HP. Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. In: Miranda MOT (Ed.). Surubim. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p.69-79. (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos: Pesca, n.19).

Shimoda E, Andrade DR, Vidal Júnio MV, Godinho HP, Yasui GS. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces – characidae). *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.59, p.877-882, 2007.

Streit Jr DP, Benites C, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Caldieri RF. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciênc Anim Bras*, v.7, p.289-297, 2006.

Streit Jr DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Moraes GV, Galo JM, Digmayer M. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. *Bol Inst Pesca*, v.34, p.337-344, 2008a.

Streit Jr DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Moraes GV, Vargas LDM, Watanabe AL. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus*, Valenciennes, 1850). *Braz J Biol*, v.68, p.373-377, 2008b.

Vazzoler AEAM (Ed.). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM. 1996. 169p.