

## CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DA CARPA COMUM, *Cyprinus carpio*, VARIEDADE ORNAMENTAL, POR RESFRIAMENTO

Nilsa Hoffmann PADUA<sup>1</sup>; Eduardo SHIMODA<sup>2</sup>; Paula de Sousa BARBOSA<sup>3</sup> & Geraldo PEREIRA JUNIOR<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Castelo – Facastelo: nilsatar@terra.com.br  
Rua Nicanor Marques, s/n , 29360-000 - Castelo, ES - Brasil

<sup>2</sup> Universidade Candido Mendes – UCAM-Campos: shimoda@ucam-campos.br  
Rua: Anita Pessanha, 100, Parque São Caetano – Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Email: manatee\_psb@hotmai.com  
Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, Aleixo, 69083-000 - Manaus, AM - Brasil

<sup>4</sup> Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Email: geraldoipa@hotmail.com  
Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I – Manaus, AM- Brasil

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da conservação do sêmen da carpa comum, variedade ornamental, sob resfriamento a 4 °C. Foram utilizados oito peixes, vertendo sêmen mediante massagem abdominal. Após a aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa, as amostras seminais foram extrusadas, sendo descartadas as contaminadas com sangue, fezes e/ou urina e as que apresentaram motilidade inferior a 80%. Cada amostra foi dividida em dois tubos de ensaio, sendo um deles mantido em temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e o outro mantido sob resfriamento (4 ± 2 °C). Para análise da motilidade direta subjetiva, o sêmen foi pré-diluído misturando-se 1 gota de sêmen + 4 gotas de solução aquosa não ativadora de NaCl a 2%. A ativação dos espermatozoides foi efetuada mediante adição de 4 gotas de água destilada a uma gota da mistura, já ao microscópio pré-focalizado. As análises de motilidade, tanto do sêmen mantido à temperatura ambiente quanto do conservado sob resfriamento, foram realizadas a cada 1 hora. A motilidade do sêmen ( $\hat{Y}$ ) foi reduzindo-se, em função do tempo mantido à temperatura ambiente (X), segundo a equação:  $\hat{Y} = 93,2 - 13,0.X$  (P<0,01; R<sup>2</sup> ajustado = 81,7%). O sêmen resfriado apresentou motilidade constante num platô de 91,5% de motilidade por 4,4 horas, após o qual a motilidade ( $\hat{Y}$ ) caiu conforme transcorria o tempo sob resfriamento (X), de acordo com a equação:  $\hat{Y} = + 130,9 - 8,60.X$  (P<0,01; R<sup>2</sup> ajustado = 79,7%). Concluiu-se que o sêmen mantido sob resfriamento pode ser utilizado por até 11,7 horas.

**Palavras Chave:** Resfriamento, sêmen, motilidade, carpa, reprodução.

### ABSTRACT

The objective of this study was to assess the feasibility of semen preservation of common carp, ornamental variety, in the refrigerator at 4 °C. Eight fish were used, pouring semen by abdominal massage. After application of crude extract of carp pituitary, the semen samples were extruded, and discarded the contaminated blood, feces and / or urine and showed that less than 80% motility. Each sample was divided into two tubes, one being maintained at room temperature (25 ± 3 °C) and the other kept in the refrigerator (4 ± 2 °C). For analysis of subjective motility, semen was pre-diluted by mixing one drop of semen + 4

drops of non-activating aqueous solution of NaCl 2%. The activation of the spermatozoa was performed by addition of 4 drops of distilled water to a drop of the mixture, since the microscope pre-focused. The analysis of sperm motility, both semen and kept at room temperature the stored under cooling, were taken every 1 hour. The motility of sperm (Y) is being reduced as a function of time held at room temperature (X) according to the equation:  $Y = 93.2 - 13.0 \cdot X$  ( $P < 0.01$ ; adjusted  $R^2 = 81,7\%$ ). The cooled semen constant motility had a plateau of 91.5% motility for 4.4 hours, after which the spermatozoa (y) decreased with time under cooling (X), according to the equation:  $y = \pm 130,9 - 8.60 \cdot X$  ( $P < 0.01$ , adjusted  $R^2 = 79.7\%$ ). It was found that semen can be kept in the refrigerator until used for 11.7 hours.

**Keywords:** Cooling, semen motility, carp, reproduction.

## 1 – Introdução

Métodos de conservação de sêmen a curto prazo existem para algumas espécies de peixes (Menezes *et al.*, 2008; Sanches e Cerqueira, 2011) e podem ser aplicados em programas de rotina em reprodução. Este método é menos estressante, prolongando a viabilidade dos espermatozoides dos peixes mantidos em cativeiro, garantindo assim o estoque de sêmen que será usado na reprodução artificial (Carneiro, 2007). Os espermatozoides são imóveis no plasma seminal, portanto são adequados para a preservação a curto prazo desde que não haja gasto energético para sua locomoção, o que dispensa suprimento de substrato nos diluentes.

Os fatores mais importantes para o sucesso da conservação são: Redução da temperatura; oxigênio para troca gasosa; prevenção de crescimento bacteriano; prevenção do ressecamento. Temperaturas baixas, acima do ponto de congelamento não são usadas, pois danificam os espermatozoides de peixes (Carneiro, 2007). A escolha da espécie e de bons reprodutores também são importantes para conservação, assim como a coleta e higiene da mesma. A conservação sob resfriamento a curto prazo pode aumentar a eficiência do sêmen, na desova artificial. A conservação de sêmen a curto prazo tem como finalidade ajudar no manejo e aumentar a eficiência da reprodução artificial em estações de piscicultura (Oliveira *et al.*, 2007).

O sucesso da preservação está diretamente ligado ao ambiente em que o sêmen será armazenado, ao manuseio no campo e ao seu transporte. Procedimentos simples podem ser usados para conservar a curto prazo espermatozoides desde que eles permaneçam imóveis ou inativos. Para uma eficaz preservação do sêmen são necessários: diminuição da temperatura, disponibilidade de oxigênio para trocas gasosas, prevenção de crescimento bacteriano e prevenção do ressecamento (Murgas *et al.*, 2003).

O uso de gelo para preservação do sêmen de peixes de clima temperado é uma prática antiga (Kavamoto *et al.*, 1987). Hara *et al.* (1982) armazenaram sêmen diluído de *Chanos chanos* em temperatura entre 0 e 4 °C, em refrigerador doméstico, por um período de 4 a 10 dias. Estudando *Cyprinus carpio*, Ravinder *et al.* (1997) testaram várias soluções diluentes e três temperaturas de resfriamento, sendo avaliados parâmetros como velocidade espermática e frequência de batimento flagelar. A temperatura de 5 °C, quando comparada a de 2 e 22 °C, foi a que apresentou melhores resultados.

As vantagens do sêmen criopreservado incluem sincronização da disponibilidade de gametas, conservação de variedade genética em populações domesticadas e a formação de bancos genéticos para espécies ameaçadas (Shimoda *et al.*, 2007). Portanto o objetivo do presente trabalho foi verificar a viabilidade da utilização do resfriamento a 4 °C como método de preservação a curto prazo do sêmen de *Cyprinus carpio*, variedade ornamental.

## 2 – Materiais e Métodos

O experimento foi realizado durante o mês de julho de 2005, em estações de piscicultura do Núcleo de Educação Ambiental de Castelo-ES (2 peixes) e do PRONAF, localizado em Itaicí, distrito de Muniz Freire-ES (6 peixes).

Exemplares da espécie *Cyprinus carpio*, variedade ornamental, foram despescados dos tanques externos de cultivo e os machos que apresentaram estágio de maturação avançada, verificada pela vertência de sêmen sob compressão abdominal, foram transportados ao laboratório. Foi procedida, a seguir, biometria (medição do peso e comprimento-padrão) dos peixes e identificação. Os peixes foram marcados utilizando-se fios de diferentes cores. Os oito exemplares apresentaram peso (média  $\pm$  desvio-padrão) de  $710 \pm 778$ g e comprimento-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão) de  $31,0 \pm 8,6$ cm.

Posteriormente, foi realizada a indução hormonal segundo Woynarovich e Horvath (1983), utilizando-se 0,5 mg de extrato bruto de hipófise de carpa por quilograma de peso vivo, após o que foram mantidos em tanques internos ao laboratório.

O sêmen foi extrusado 12 horas após a hipofiseção, mediante massagem abdominal no sentido ântero-posterior, sendo coletado em tubos de ensaio de 5 ml. O poro urogenital, assim como as regiões adjacentes, foram devidamente secas e limpas. Amostras contaminadas com sangue e/ou fezes foram descartadas, sendo a verificação desta contaminação realizada por observação visual. Para verificação da contaminação com urina, após a coleta, 1 gota de sêmen de cada amostra foi colocada numa lâmina e observado ao microscópio ótico. As amostras que, mesmo sem adição de solução ativadora, apresentaram alguma motilidade, foram descartadas.

O sêmen coletado de cada exemplar foi dividido em 2 tubos de ensaio de 5 ml, sendo que um foi mantido à temperatura ambiente e outro, acondicionado sob resfriamento. As amostras mantidas sob resfriamento, foram acondicionadas em caixa térmica com gelo. As temperaturas, tanto das amostras sob resfriamento quanto da temperatura ambiente, foram monitoradas utilizando-se termômetro digital, com precisão de 0,1 °C.

As lâminas para análise de motilidade foram preparadas, segundo metodologia adaptada a partir de Billad e Cosson (1992): (1) adicionaram-se 4 gotas de solução aquosa de NaCl a 1,2% (solução não-ativadora) a uma gota de sêmen; (2) a 1 gota da solução diluída foi adicionada a 4 gotas de água destilada para ativar a motilidade dos espermatozoides.

As amostras foram analisadas em microscópio ótico comum, totalizando um aumento de 400 vezes, avaliadas durante 16 horas (tempo 0 a 16). Os resultados subjetivos da motilidade espermática foram anotados.

A partir das motilidades espermáticas, foram obtidas 2 equações de regressão, relacionando as motilidades das amostras com o tempo de manutenção à temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C) e sob resfriamento ( $4 \pm 2$  °C). Os resultados da motilidade do sêmen em função do tempo em cada tratamento (resfriado ou à temperatura ambiente) foram comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dois tratamentos, em cada tempo, foram comparados pelo teste t com dados pareados.

## 3 – Resultados

Os dados individuais referentes às motilidades espermáticas avaliadas subjetivamente a cada hora são apresentados na Tabela 1, enquanto que a comparação das médias em cada tratamento, na Tabela 2.

Embora o procedimento proposto por Billard e Cosson (1992) preconize uma pré-diluição não ativadora (da ordem de 100 vezes) seguida da diluição ativadora (de 20 vezes), no presente trabalho as diluições foram de menores proporções. Entretanto, a observação das

amostras ao microscópio mostrou os espermatozoides bem dispersos, sendo permitida a visualização individualizada dos mesmos. Em adição as motilidades do sêmen, a fresco, observadas foram próximas de 100%, o que evidencia a ativação de praticamente todos os espermatozoides com potencial de motilidade.

Pôde-se notar que, nos dois tratamentos (sêmen à temperatura ambiente e sob resfriamento), a motilidade em geral manteve-se constante em todas as amostras até 1 hora após a coleta.

A partir de 2 horas, as amostras mantidas à temperatura ambiente apresentaram decréscimo contínuo, sendo que a partir de 8 horas, foi observada ausência de motilidade das amostras (Tabelas 1 e 2). Ainda, na Tabela 2 pode-se observar que a motilidade das amostras após 2 horas de manutenção sob temperatura ambiente é significativamente menor, quando comparada ao sêmen a fresco (Tabela 2).

Nas amostras seminais mantidas sob resfriamento a 4 °C, verificou-se pequena redução da motilidade espermática até 6 horas, porém sem diferenças significativas, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 2). Nota-se que, 15 horas após a coleta, o sêmen mantido sob resfriamento de um dos exemplares ainda apresentava motilidade (Tabela 1), valor este muito superior ao verificado no sêmen mantido à temperatura ambiente, em que a última motilidade observada ocorreu 7 horas após a coleta.

Comparando-se as médias da motilidade do sêmen à temperatura ambiente e resfriado (Tabela 2 – comparação nas linhas – letras minúsculas), não há diferença significativa, pelo teste t com dados pareados, na motilidade até 1 hora após a coleta. De 2 a 13 horas, a motilidade do sêmen mantido sob resfriamento é significativamente maior do que no sêmen a temperatura ambiente. Nos períodos posteriores, em função da motilidade do sêmen sob resfriamento atingir valores próximos de 0%, as médias dos tratamentos não diferem significativamente.

Na Figura 1 é possível observar o efeito linear do tempo de manutenção do sêmen à temperatura ambiente (X) sobre a motilidade espermática ( $\hat{Y}$ ), segundo a equação:  $\hat{Y} = 93,2 - 13,0.X$ : ( $P < 0,01$ ;  $R^2$  ajustado = 81,7%). Na Figura 2, observa-se a motilidade espermática variando de acordo com o tempo de preservação sob resfriamento a  $4 \pm 2$  °C. A motilidade permanece constante num platô de 91,5% até 4,4 horas após a coleta. Posteriormente, a motilidade cai linearmente de acordo com a equação que permite estimar a motilidade ( $\hat{Y}$ ) em função do tempo (X):  $\hat{Y} = -8,60.X + 130,9$ : ( $P < 0,01$ ;  $R^2$  ajustado = 79,7%).

Considerando a motilidade de 30% como a mínima viável para uso do sêmen, verificou-se que o sêmen é viável por mais tempo quando conservado sob resfriamento (11,7 horas) em relação ao mantido à temperatura ambiente (4,9 horas).

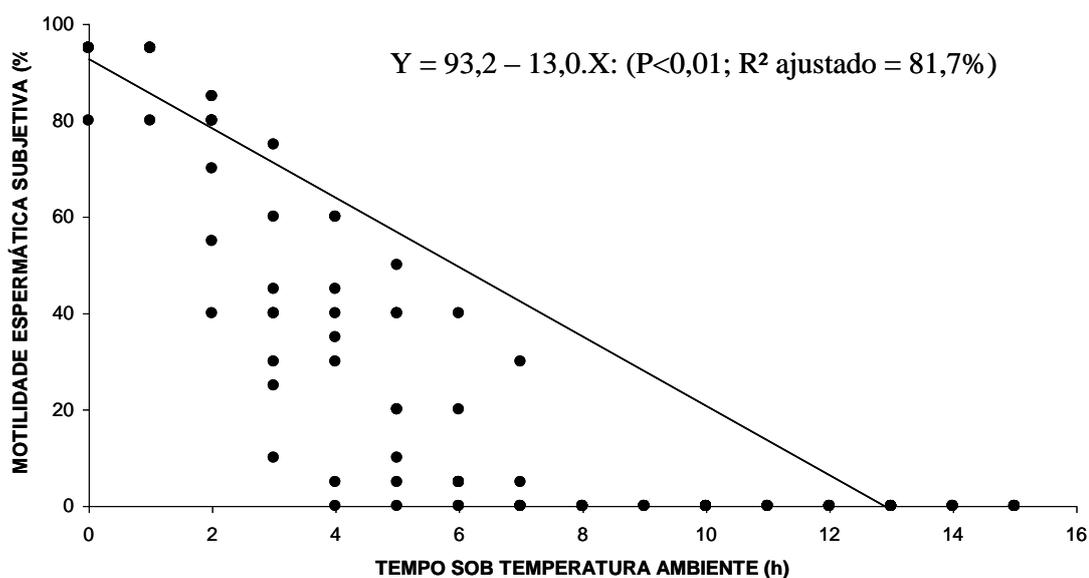
**Tabela 1:** Motilidades espermáticas subjetivas (em %): valores individuais dos 8 peixes (P1 a P8), médias (X), desvios-padrão (s), Coeficientes de Variação (C.V.) e Intervalos de confiança (I.C. – 5% de significância), de amostras de sêmen mantidas à temperatura ambiente (TA) ou sob resfriamento à 4°±2°C (R), analisadas a cada 1 hora (tempo 0 a 16h).

	Tempo	0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16			
		TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R	TA	R												
Motilidade	P1	95	95	95	95	40	95	10	95	0	95	0	90	0	85	0	60	0	55	0	35	0	20	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P2	95	95	95	95	55	95	30	90	30	85	20	80	20	80	5	70	0	60	0	50	0	40	0	20	0	10	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	P3	95	95	95	95	85	90	75	90	60	90	20	85	5	80	0	80	0	75	0	65	0	50	0	35	0	20	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	P4	95	95	95	95	85	95	40	90	35	90	10	70	0	50	0	50	0	50	0	45	0	40	0	20	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P5	95	95	95	95	80	95	60	90	60	90	50	90	40	80	30	75	0	75	0	75	0	70	0	65	0	55	0	35	0	10	0	0	0	0	0	0
	P6	95	95	95	95	80	95	45	95	45	95	40	95	5	90	0	90	0	90	0	80	0	75	0	65	0	60	0	40	0	15	0	5	0	0	0	0
	P7	80	95	80	95	70	95	40	95	40	95	40	95	5	90	0	80	0	75	0	75	0	75	0	60	0	50	0	20	0	5	0	0	0	0	0	0
	P8	95	80	95	80	80	80	25	75	5	75	5	75	5	60	0	50	0	50	0	45	0	40	0	25	0	10	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
X	93	93	93	93	72	93	41	90	34	89	23	85	10	77	4	69	0	66	0	59	0	51	0	38	0	26	0	14	0	4	0	1	0	0	0		
S	5	5	5	5	16	5	20	7	22	7	18	9	14	14	11	15	0	15	0	17	0	20	0	23	0	25	0	16	0	6	0	2	0	0	0	0	
C.V. (%)	6	6	6	6	23	6	50	7	65	8	79	11	136	19	240	21	-	22	-	29	-	39	-	60	-	94	-	116	-	155	-	282	-	-	-	-	
I.C.	4	4	4	4	14	5	17	6	19	6	15	8	11	12	9	12	-	12	-	14	-	17	-	19	-	21	-	13	-	5	-	2	-	-	-	-	

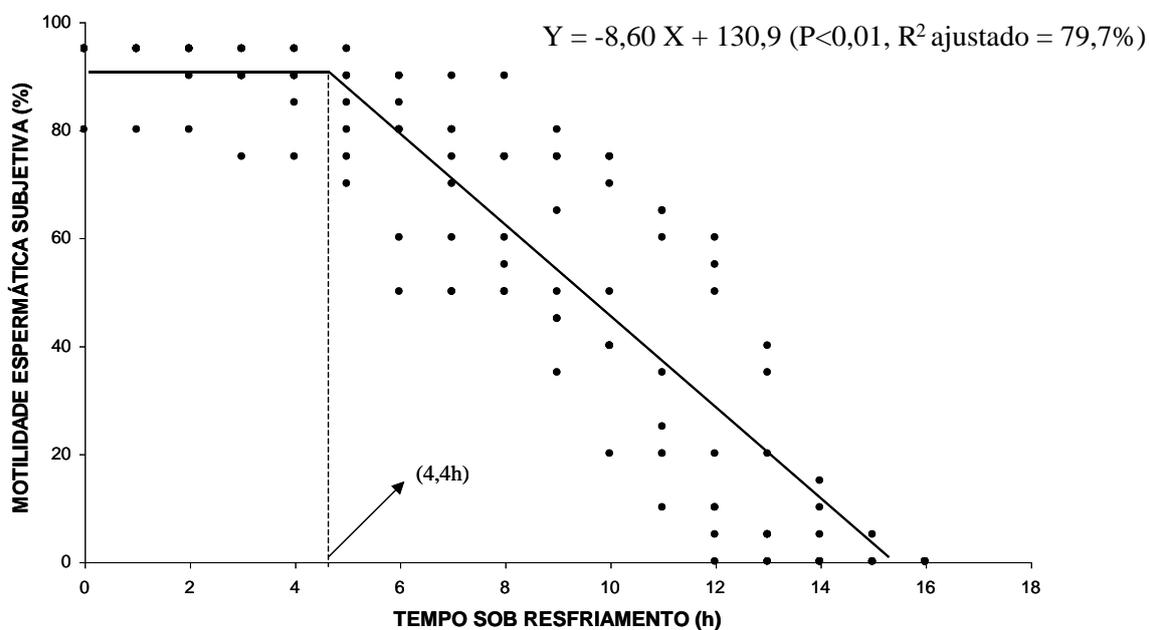
**Tabela:** Comparação entre médias da motilidade espermática subjetiva do sêmen de carpa comum, variedade ornamental, mantido à temperatura ambiente ( $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) ou sob resfriamento à ( $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), medida a cada 1 hora, durante 16 horas.

HORA	TEMPER AMBIENTE		RESFRIADO	
0	93±5	a A	93±5	a A
1	93±5	a A	93±5	a A
2	72±16	a B	93±5	b AB
3	41±20	a C	90±7	b AB
4	34±22	a C	89±7	b ABC
5	23±18	a CD	85±9	b ABC
6	10±14	a DE	77±14	b ABCD
7	4±11	a E	69±15	b BCDE
8	0±0	a E	66±15	b CDE
9	0±0	a E	59±17	b DEF
10	0±0	a E	51±20	b EF
11	0±0	a E	38±23	b FG
12	0±0	a E	26±25	b GH
13	0±0	a E	14±16	b HI
14	0±0	a E	4±6	a HI
15	0±0	a E	1±2	a I
16	0±0	a E	0±0	a I

\* Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (maiúscula) e teste t com dados pareados (minúscula), ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 1:** Motilidade espermática subjetiva (%) do sêmen de carpa *Cyprinus carpio* conservado em temperatura ambiente.



**Figura 2:** Motilidade espermática subjetiva (%) do sêmen de carpa *Cyprinus carpio* conservado sob resfriamento a 4°±2°C por diferentes períodos.

#### 4 – Discussão

A motilidade inicial média de 93% obtida neste experimento foi semelhante á encontrada no sêmen de ariocó (*Lutjanus synagris*) com motilidade superior a 90%, permanecendo móvel por  $137 \pm 20$  segundos (Sanches e Cerqueira, 2010). Em estudo realizado com bagres (*Rhamdia hilarii*), essa motilidade foi de 81,90% e 86,73% de espermatozóides vivos, avaliados objetivamente pela coloração diferencial (Kavamoto e Silveira, 1986).

Shimoda *et al.* (1999) avaliaram a motilidade no sêmen recém extrusado do pacu (*P. mesopotamicus*), encontrando  $67,5 \pm 25,6\%$  de espermatozóides móveis, inferior, portanto ao obtido no presente trabalho, que foi de  $93 \pm 5\%$ . Além da diferença na média, percebem-se desvios-padrão bem contrastantes. Dentre as possíveis razões desta diferença nos desvios-padrão, poderiam ser citados: estágios de maturação diferentes nos exemplares utilizados nas duas espécies, o descarte de amostras contaminadas por urina realizado neste trabalho, e a metodologia de análise da motilidade. No trabalho de Shimoda *et al.* (1999) a análise de motilidade foi procedida adicionando-se duas gotas de água destilada a uma gota de sêmen. Segundo Billard e Cosson (1992) baixas diluições do sêmen podem implicar em ativação parcial e não simultânea dos espermatozóides, levando a grandes variações no valor da motilidade espermática. No presente trabalho, foi utilizada a metodologia de diluição em duas etapas, adaptada a partir dos últimos autores.

Estudos realizados por Ravinder *et al.* (1997) testando diferentes temperaturas de resfriamento de sêmen em *Cyprinus carpio* verificaram que na temperatura de 5 °C, o sêmen manteve-se com boa velocidade espermática e batimento flagelar, quando comparado com temperaturas variando de 2 à 22 °C.

Segundo Billard e Cosson (1992), o plasma seminal é degradado com o tempo devido, por exemplo, a deterioração das proteínas contidas no sêmen o que danifica os espermatozóides. Nas amostras mantidas à temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C), o processo de deterioração é mais rápido do que se mantido sob resfriamento a ( $4 \pm 2$  °C). Billard e Cosson (1992), inclusive, propõem um procedimento em que, após a centrifugação do sêmen, o plasma seminal seja descartado e os espermatozóides então ressuspensos em outra solução artificial, ausente de proteína. Isto reduziria a degradação do sêmen e aumentaria o tempo de conservação.

Dois fatores podem contribuir para a queda acentuada na taxa de motilidade espermática: a contaminação bacteriana do sêmen, resultante do método de coleta, e a proporção de diluição utilizada (Sanches e Cerqueira, 2011). A coleta de sêmen, por meio de massagem abdominal, produz uma alta taxa de contaminação bacteriana, em razão do contato do sêmen com o muco externo do peixe; e o prolongamento das condições de estocagem, durante a refrigeração, pode afetar a qualidade do sêmen pelo desenvolvimento de bactérias (Rurangwa *et al.*, 2004).

Em experimentos que visem a criopreservação do sêmen coletado na natureza para formação de bancos genéticos, a manutenção do sêmen resfriado da piabanha (*Brycon insignis*) a 4 °C, por até 4 horas pode ser utilizada, sem que ocorram perdas na motilidade das amostras (Shimoda *et al.*, 2007).

Segundo Marques e Godinho (2004) o resfriamento de amostras seminais de *L. elongatus* e *L. friderici* mantiveram motilidades superiores a 30% por até 7h sob resfriamento e poderiam ter aplicações práticas na reprodução artificial. A mesma autora também verificou que esta motilidade de 30% ocorre após 19h sob resfriamento, trabalhando com sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). O sêmen das três espécies foi mantido sob resfriamento em um saco plástico inflado com oxigênio.

O tempo de viabilidade do sêmen conservado a 4°C da carpa comum obtido no presente trabalho foi superior ao verificado por Marques e Godinho (2004), nas espécies *L. elongatus* e *L. friderici*, em que as motilidades foram superiores a 30% por até 7h sob resfriamento. Entretanto, foi inferior ao verificado no pacu, de 19 horas, pelos mesmos autores. Possivelmente, a manutenção do sêmen em saco plástico inflado com oxigênio possa ter influenciado positivamente a conservação do sêmen do *P. mesopotamicus*.

## 5 – Conclusão

A conservação do sêmen da carpa a 4 °C permite a manutenção da motilidade em pelo menos 30% e a aplicação prática por até 11,7 horas.

## 6 – Referências

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. *The Journal of Experimental Zoology*, v.261, p.122-131, 1992.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista brasileira de reprodução animal*, v. 31, p. 361-366, 2007.

HARA, S.; CANTO JR, J. T.; ALMENDRAS, J. M. E. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos*, sperm preservation. *Aquaculture*, v. 28, p.339-346, 1982.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. *B. Inst. Pesca*, v.13, p.95-100, 1986.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI, W. S.; RIGOLINO, M. G.; TABAT, Y. A.; CAMPOS, B. E. S. C. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta-arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. *B. Inst. Pesca*, v.14, p.51-62, 1987.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. *Arquivos de Biologia e Tecnologia, Brasil*, v. 47, p. 799-804, 2004.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES Jr, J. B. Avaliação espermática pós-congelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amazonica*, v. 38, p. 365-368, 2008.

MURGAS, L. D.S.; FRANCISCATTO, R.T.; SANTOS, A. G.O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *R. Bras. Zootec*, v. 32, p. 1810-1814, 2003.

OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T F.; IZAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 59, p. 1509-1515, 2007.

RAVINDER, K., NASARUDDIN, K. C. e SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology*, v.50, p. 1309-1328, 1997.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v.234, p.1-28, 2004.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. *Bol. Inst. Pesca*, v. 36, p. 293-305, 2010.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. *Pesq. Agropec. Bras*, v.46, p. 1673-1680, 2011.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; SILVA, J. F. S.; CRUZ, G. M. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) hipofisado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 248-250, 1999.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL Jr., M. V. GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.877-882, 2007.

SHIMODA, E. ANDRADE, D. R. VIDAL JR., M.V.; YASUI, G. S.; SILVA, J. F. S. GODINHO, H. P.; SOUZA, G. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. *Ceres*, v.54, p. 430-433. 2007.

WOYNAROVICH, E., HORVATH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: FAO/CODEVASF/CNPq. Brasília. 200 p; 1983.