

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
METODOLOGIA APLICADA À CONCLUSÃO DE CURSO**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS
ESPERMATOZÓIDES DE PEIXES**

LUIS FERNANDO GUERRERO GRACIA

2011/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
METODOLOGIA APLICADA À CONCLUSÃO DE CURSO**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS
ESPERMATOZÓIDES DE PEIXES**

LUIS FERNANDO GUERRERO GRACIA

Matrícula: 00124279

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado junto ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: prof. Dr. Danilo Pedro Streit Júnior

Coorientadora: profa. Dra. Ender Rosana Oberst

2011/1

RESUMO

Nem todas as espécies de peixes são capazes de reproduzir em cativeiro, tornando necessária a utilização de técnicas artificiais para atingir este objetivo. Para tanto, a boa qualidade dos espermatozoides a serem utilizados é muito importante. Diversos fatores podem influenciar a morfologia dos espermatozoides de peixes, tais como: osmolalidade do meio de ativação, nutrição, método de coloração para a análise morfológica, idade do reprodutor e indução hormonal. O percentual de patologias encontradas pode comprometer a viabilidade, apesar de não existirem estudos que comprovem tal afirmação. Esta revisão tem o objetivo de reunir informações sobre os fatores que interferem na morfologia dos espermatozoides de peixes, assim como sobre as patologias espermáticas encontradas na análise morfológica.

ABSTRACT

Not all species of fish are able to breed in captivity, requiring the use of artificial techniques to achieve this purpose. For this, is very important the quality of semen to be used. Several factors may influence the morphology of spermatozoa in fish, such as activation osmolality of the medium, nutrition, staining method for the morphological analysis, reproductor age and hormonal induction. The percentage of pathologies found may compromise the viability, although there are no studies to prove this assertion. This review aims to gather information about factors that affect the morphology of spermatozoa in fish as well as on the conditions found in the sperm morphological analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 FATORES QUE INFLUENCIAM A MORFOLOGIA	9
3 PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS.....	11
4 CONCLUSÕES.....	16
REFERÊNCIAS	17

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação e nomenclatura de defeitos de espermatozóides de peixes.....	11
--	----

1 INTRODUÇÃO

A pesca desempenha, historicamente, um papel de extrema importância na segurança alimentar mundial, porém, com a exploração indiscriminada dos recursos pesqueiros surge o problema de esgotamento dos estoques e a estagnação da quantidade de peixe extraído do ambiente natural. A alternativa natural e a solução possível para o suprimento desse mercado passam a ser a aquicultura, tendo em vista o grande potencial de produzir organismos aquáticos em cativeiro. Porém, muitas espécies não são capazes de reproduzirem em cativeiro. Em algumas espécies, como é o caso do dourado (*Salminus maxillosus*), a maturação das gônadas nos dois sexos muitas vezes não é síncrona. Nestes casos, seria útil preservar os gametas para uso em inseminação artificial como e quando necessário. (COSER; GODINHO; RIBEIRO, 1984). Para isso é necessário utilizar métodos artificiais de reprodução.

A manipulação artificial do ciclo reprodutivo constitui uma técnica para a indução da desova e espermição, permitindo que ocorra a reprodução destes indivíduos no momento desejado e em condições controladas de cativeiro. (MURGAS *et al.*, 2011). Para tanto, é importante estabelecer um critério para identificação de peixes aptos à indução. (NARAHARA *et al.*, 2002), tendo em vista que a viabilidade dos espermatozoides é essencial para que o processo reprodutivo seja eficiente em peixes (STREIT JR. *et al.*, 2008a).

A qualidade do sêmen é de fundamental importância no processo de reprodução natural e artificial, refletindo no sucesso da fertilização. A eficiência deste processo está diretamente ligada à qualidade dos gametas, tanto masculinos quanto femininos. (SOARES *et al.*, 2010).

O conhecimento do número de patologias totais, bem como das proporções ideais de espermatozoides vivos e mortos e de espermatozoides por oócito, representará um importante avanço rumo ao conhecimento e ao estabelecimento de doses mínimas de amostras de sêmen capazes de produzir taxas de fertilização, eclodibilidade e sobrevivência de larvas satisfatórias e com elevada repetibilidade. (MILLIORINI, 2006).

Não existem estudos comprobatórios de que espermatozoides de peixes com anormalidades não fecundem. 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 (STREIT JR. *et al.*, 2008). Não se pode inferir medidas de aceitáveis ou não para sêmen de peixes, por não haver parâmetros estabelecidos (STREIT JR. *et al.*, 2006)

Esta revisão tem o objetivo de reunir informações sobre os fatores que interferem na morfologia dos espermatozoides de peixes, assim como sobre as patologias espermáticas encontradas na análise morfológica.

2 FATORES QUE INFLUENCIAM A MORFOLOGIA

Diversos fatores podem influenciar a morfologia dos espermatozóides de peixes, tais como: osmolalidade do meio de ativação, nutrição dos reprodutores, método de coloração da célula espermática e idade do reprodutor.

Os espermatozóides de Lúcio (*Esox lucius*), quando ativados em meio hiposmótico (<125 mOsmol kg⁻¹), apresentam alterações semelhantes a bolhas ao longo do flagelo, as quais impedem a correta e eficiente onda de propagação do flagelo espermático e causam alterações na motilidade espermática (ALAVI *et al.*, 2009b).

Alavi *et al.* (2009a), ao analisarem o sêmen de barbo (*Barbus barbus*) alimentados com dietas contendo três concentrações diferentes (0, 22 e 44%) de larvas de chironomídeo (*Chironomus plumosus*), congeladas observaram que houve um aumento significativo do comprimento total, do comprimento da cabeça, da largura da cabeça, largura anterior e posterior da peça intermediária dos espermatozóides coletados de reprodutores dos grupos que receberam os chironomídeos em relação ao grupo que não recebeu.

O método de coloração é um fator que pode interferir na análise morfológica. Tuset *et al.* (2008) avaliaram três diferentes kits de coloração (Diff-Quick®, Hemacolor® e Spermac®) e constatou que as cabeças de espermatozóides corados com Diff-Quick foram mais facilmente avaliadas, em que as medições puderam ser feitas em 98,8% dos espermatozóides cabeças em comparação com 90,7% para Hemacolor e 76,1% para Spermac. Os autores consideraram o Diff-Quick como o mais adequado para análise morfológica de espermatozóides da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). O melhor contraste para a análise da cauda foi observado com o kit de coloração Spermac e foi ainda possível medir o comprimento da peça final.

Streit Jr. *et al.* (2004) analisaram a morfologia de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando três corantes (vermelho congo, rosa bengala e Williams-modificado) combinados com três soluções fixadoras (formol salino tamponado, citrato sódio diidratado a 3% e água destilada). Observou-se que quando o sêmen foi diluído em citrato sódio diidratado a 3% e em água destilada os espermatozóides sofreram deformações anatômicas e aglutinação, inviabilizando a análise. A melhor associação foi encontrada ao utilizar rosa bengala e formol salino tamponado, pois apresentou baixa sujidade e melhor eficácia do corante, quando comparado com as outras associações.

Gasparini *et al.* (2010) ao compararem sêmen de machos velhos e jovens da espécie guppy (*Poecilia reticulata*), observaram que os jovens apresentaram menor comprimento de

flagelo em relação aos machos velhos, sendo que o comprimento do flagelo foi de $44,65\mu\text{m} \pm 2,52$ e $45,99\mu\text{m} \pm 1,76$, respectivamente.

3 PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS

Na avaliação dos defeitos espermáticos do sêmen de peixes, autores como Miliorini (2006), sugeriram algumas classificações e nomenclatura de defeitos, conforme se observa na **tabela 1**.

Tabela 1: Classificação e nomenclatura de defeitos de espermatozóides de peixes.

Classificação do defeito	Características observadas na célula
Patologias maiores	
Macrocefalia	Espermatozóides que apresentam cabeça gigante, com contorno e forma anormais, sem aparente degeneração cromatínica ou vacuolar.
Microcefalia	Espermatozóides com cabeça de tamanho reduzido, com contorno e forma anormais, sem degeneração cromatínica ou vacuolar aparentes.
Cabeça degenerada	Espermatozóides com cabeça de tamanho e forma normais, mas que apresentavam contorno irregular e ou degenerações cromatínica ou vacuolar aparentes.
Peça intermediária degenerada (PID)	Alterações em espessura (terço médio da peça intermediária), densidade, difração e comprimento da peça intermediária, envolvendo seu contorno e sua inserção à cabeça (colo).
Cauda fraturada	Células espermáticas com fratura e retenção da cauda.
Cauda fortemente enrolada	Dobradura e enovelamento da cauda sobre si mesma ou sobre a cabeça. Foram considerados somente os enovelamentos que pudessem comprometer intensamente a motilidade espermática (sobre a cabeça ou com grande extensão da cauda acometida), sendo desconsiderados enovelamentos distais discretos.
Cauda degenerada	Espermatozóides que apresentaram descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária.
Patologias menores	
Cabeça isolada normal	Cabeças observadas sem cauda, porém sem qualquer alteração de cabeça.
Cauda dobrada	Dobradura da cauda, em diversos graus, sem envolver a si mesma ou a cabeça.

Fonte: adaptado de Miliorini (2006).

Miliorini (2006), ao analisar a frequência de patologias com a utilização de dois crioprotetores diferentes (DMSO e metanol) no sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) *in natura* e descongelado, não verificou diferença significativa entre nenhum dos crioprotetores ou entre as concentrações destes sobre as patologias menores. Observou ainda, que, com o aumento na concentração dos crioprotetores, houve uma redução linear na ocorrência de patologias totais. A percentagem média de patologias totais observada no sêmen *in natura* foi de 3%. A porcentagem de patologias totais observada no sêmen descongelado foi de 29,5%. Amostras com DMSO apresentaram menor porcentagem de caudas fraturada e degenerada. As patologias de microcefalia, cauda degenerada e PID não foram observadas no sêmen *in natura*, mas o congelamento provocou o desenvolvimento das patologias de cauda degenerada e PID. O incremento na concentração de crioprotetor promoveu um efeito protetor sobre os espermatozoides, tendo a concentração de 12,5% permitido a ocorrência de somente 25% de patologias totais. O autor sugeriu que o percentual crítico de anormalidades espermáticas de peixes de fecundação externa oscile em torno de 50%, tendo em vista que a fecundação artificial em curimba envolve a utilização de uma elevada proporção entre espermatozoides e oócitos em um ambiente controlado.

Em estudo realizado por Streit Jr. *et al.* (2009), o sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pós congelação, apresentou redução no percentual de espermatozoides normais de 41,21 para 31,50% e, conseqüentemente, ocorreu um aumento de 46,73 para 54,60% no percentual de espermatozoides com patologias primárias. Constatou-se que cauda quebrada, macrocefalia (patologias primárias), cauda dobrada e gota citoplasmática distal (patologias secundárias), aumentaram no sêmen avaliado pós congelação em relação ao *in natura*. Já a patologia de cauda solta foi observada em maior quantidade no sêmen *in natura*. O índice de espermatozoides com cauda enrolada foi superior a 20% do total das patologias registradas, tanto no sêmen *in natura* quanto no pós congelação. Segundo os autores, o aumento da ocorrência de espermatozoides com patologias primárias, pós congelação, 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 espermatozoide ficou exposto à solução crioprotetora antes de ser submetido a resfriamento (equilíbrio tempo:solução), com a curva de resfriamento e o processo de congelação.

Streit Jr. *et al.* (2006a) em experimento com diferentes diluidores utilizados em sêmen suíno observaram que de um modo geral os tipos de patologias espermáticas secundárias mais freqüentes foram cauda dobrada e, em menor número, cabeça e cauda solta. Já, para

patologias primárias, a soma das patologias de cauda dobrada foi a de maior incidência. Entretanto, espermatozóides com cauda curta e corrugada apresentaram registros frequentes. Segundo o autor, as anormalidades encontradas neste estudo parecem ser as mais corriqueiras, mesmo nos casos em que o sêmen foi avaliado *in natura*. A elevada presença de espermatozóides com diferentes patologias pode ser atribuída à exposição destes à solução crioprotetora e à congelamento dos espermatozóides.

Kavamoto *et al.* (1999) verificaram a existência de anormalidades morfológicas nos espermatozóides de curimatá (*Prochilodus scrofa*) antes e após duas aplicações de hCG. O percentual de espermatozóides com anormalidades na cabeça, peça intermediária e cauda foi igual a 9,54%. As anormalidades morfológicas da peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozóides com movimentos circulares ou oscilatórios e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de fertilização. Entre os defeitos observados, os mais comuns foram cauda dobrada e/ou enrolada e ausência de cauda. Houve aumento do número de espermatozóides com anormalidades com o aumento no número de horas de ação hormonal; que, segundo o autor, provavelmente está ligado ao processo de degeneração deste tipo celular.

Streit Jr. *et al.* (2006b) observaram que os animais induzidos e os não-induzidos, com extrato de hipófise de carpa, apresentarem elevado índice de anormalidades primárias (28,91% e 25,33%, respectivamente), representando mais que o dobro em relação as anormalidades secundárias (12,85% e 12,05%, respectivamente) encontradas no mesmo experimento.

Streit Jr. *et al.* (2008b) avaliaram o sêmen de piaparas (*Leporinus elongatus*) antes e após a indução com extrato de hipófise de carpa. Não foi encontrada diferença estatística na porcentagem de espermatozóides normais ou com patologias leves, na pré-indução (44,0 e 44,4%, respectivamente) e na pós-indução hormonal (44,3 e 46,7%, respectivamente). Porém as patologias graves foram mais frequentes no sêmen de pré-indução do que no pós-induzido com 12,2 e 8%, respectivamente. A patologia mais frequente foi cabeça solta com 27,4 e 36,3% seguida por cauda solta com 10,1 e 3,9%, antes e após a indução hormonal respectivamente. O sêmen de piapara coletado na pré-indução hormonal apresentou os melhores parâmetros qualitativos.

Moraes *et al.* (2004) avaliaram os espermatozóides de 27 carpas comuns (*Cyprinus carpio*), 55 piavuços (*Leporinus macrocephalus*) e 48 curimatás (*Prochilodus lineatus*), induzidos à reprodução com extrato de hipófise de carpa (EHC), frango (EHF) e coelho (EHCo).. Em *L. macrocephalus* induzido com EHCo, o número de espermatozóides normais

(31,2%) foi menor em relação àquele dos peixes induzidos com EHC (51%) e EHF (46,5%). Não houve diferença estatística para a incidência de espermatozóides com anormalidade primária em nenhuma espécie e em nenhum dos tratamentos. Em *L. macrocephalus* a ocorrência de anormalidade secundária foi maior nos animais induzidos com EHCo. Já em *C. carpio*, espermatozóides com anormalidade secundária foram mais freqüentes nos exemplares induzidos com EHCo em relação aos induzidos com EHC. Em *P. lineatus* não houve diferença entre as ocorrências de espermatozóides com anormalidade secundária, nos diferentes tratamentos. As anormalidades mais freqüentes em todas as espécies e em todos os tratamentos foram cabeça solta e cauda solta.

Em estudo realizado por Streit Jr *et al.* (2008a), com indução hormonal utilizando extrato de hipófise de carpa em dourados (*S. maxillosus*), 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 48,01%. Não houve diferença entre as freqüências de patologias, primárias nos tratamentos avaliados. Nas secundárias, registrou-se um aumento 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 freqüência em ambos os tratamentos. 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 às patologias primárias não houve diferença com relação à 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 freqüência (13,03%) do que nos espermatozóides observados no sêmen após a indução hormonal (19,02%).

Em experimento envolvendo a análise de sêmen de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis de vitamina C na ração, Mataveli *et al.* (2007) observaram que à medida que se elevavam os níveis de suplementação de vitamina C, a freqüência de patologias primárias aumentava, contrapondo-se à redução das patologias secundárias, não interferindo no percentual de espermatozóides normais. Segundo os autores, a redução do porcentual de patologias secundárias pode estar relacionada à melhoria do plasma seminal, em razão da suplementação gradual de vitamina C. Entretanto, a suplementação de vitamina C até 300 mg/kg de ração pode ter deixado os espermatozóides mais sensíveis em sua formação, durante a espermatogênese, ocasionando o aparecimento de

patologias primárias. Este fato sugere que teores superiores a 300 mg de vitamina C/kg de ração sejam o ideal. No entanto, neste estudo observou-se elevação do índice de patologias primárias à medida que o teor de vitamina C na dieta aumenta, atingindo o valor de 44,10%, com a adição de 300 mg de vitamina C/kg de ração, mas as patologias secundárias foram reduzidas com a crescente adição de vitamina C na dieta, atingindo o índice de 34,31% com 300 mg de vitamina C/kg de ração. Os resultados obtidos neste tratamento indicam o menor índice de patologias totais (78,41%) em relação aos demais tratamentos.

Em estudo semelhante, a concentração de vitamina C na ração não influenciou o percentual de espermatozoides normais e de espermatozoides com patologia leve ou grave (MORAES et al., 2008).

4 CONCLUSÕES

Muitos fatores podem afetar a análise morfológica dos espermatozoides de peixes, portanto o estudo de técnicas ideais de análise para cada espécie, assim como a padronização das mesmas permitirão a determinação de limites de alterações morfológicas que podem ser encontradas em um sêmen de boa qualidade. A padronização de patologias espermáticas é outro fator que poderá facilitar a pesquisa nesta área.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, Sayyed M. H.; PSENICKA, Martin; POLICAR, Tomás; RODINA, Marek; HAMACKOVA, Jitka; KOZAK, Pavel; LINHART, Otomar. Sperm quality in male *Barbus barbuis* L. fed different diets during the spawning season. **Fish Physiol Biochem**, v. 35, p. 683–693, 2009a.
- ALAVI, Sayyed M.H.; RODINA, M.; VIVEIROS, Ana T.M.; COSSON, J.; GELA, David; BORYSHPOLETS, Sergei; LINHART, Otomar. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellarwave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). **Theriogenology**, v. 72, p. 32–43, jan. 2009b.
- COSER, Ana M.; GODINHO, Hugo; RIBEIRO, Dirceu. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, v. 37, p. 387-390, 1984.
- GASPARINI, C.; MARINO, I.A.M.; BOSCHETTO, C.; PILASTRO, A. Effect of male age on sperm traits and sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Journal of Evolutionary Biology*, Padova, v. 23, p. 124-135, 2010.
- KAVAMOTO, Emico T.; BARNABE, Valquíria H.; DE CAMPOS, Benedicto do E. S.; ANDRADE-TALMELLI, Elaine F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p. 61-66, set. 1998.
- MATAVELI, Marcela; MORAES, Gentil V.; STREIT JR., Danilo P.; MENDEZ, Lauro D.V.; SAKAGUTI, Eduardo S.; TONINATO, Jerri C.; BARBOSA, Rejane C.; MERLINI, Luiz. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 33(1), p. 1 - 7, 2007.
- MILIORINI, A.B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- MORAES, Gentil V.; STREIT JR., Danilo P.; RIBEIRO, Ricardo P.; SAKAGUTI, Eduardo S.; SOUZA, Ederval D.; POVH, Jayme A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*leporinus macrocephalus*), curimatá (*prochilodus lineatus*) e carpa comum (*cyprinus carpio*). **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 30(2)p. 109-116, 2004.
- MORAES, Gentil V., MATAVELI, Marcela; STREIT JR., Danilo P.; RIBEIRO, Ricardo P.R.; GASPARINO, Eliane; ZAGO, Cláudia H.F. Qualidade de sêmen de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas com diferentes níveis de vitamina C. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras.
- MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.186-191, abr./jun. 2011.

NARAHARA, Massuka Y., ANDRADE-TALMELLI, Elaina F.; KAVAMOTO, Emico T; GODINHO, Heloisa M. Reprodução induzida da pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.3, p.1070-1075, 2002.

SOARES, Frederico A. C.; STREIT JR., Danilo P.; EBERT, André R.; COLDEBELLA, Ivanir J.; OBERST, Enefer R. Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 17, n. 3/4, p. 129-133, set./dez. 2010.

STREIT JR., Danilo P.; MORAES, Gentil V.; RIBEIRO, Ricardo P.; POVH, Jayme A.; SOUZA, Ederval D.; OLIVEIRA, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 7(2), p. 157-162, 2004

STREIT JR., Danilo P.; BENITE, Celso; MORAES, Gentil V.; RIBEIRO, Ricardo P.; SAKAGUTI, Eduardo S.; CALDIERI, Rivail F. Sêmen de pacu (*piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 289-297, jul./set. 2006a.

STREIT JR., Danilo P.; RIBEIRO, Ricardo P.; MORAES, Gentil V.; MENDEZ, Lauro V.; GALLO, Juliana M.; DIGMAYER, Melanie; POVH, Jayme A. Características qualitativas do sêmen de pacu (*piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 119-125, Sept./Dec. 2006b.

STREIT JR., Danilo P.; SIROL, Rodolfo N.; MORAES, Gentil V.; GALO, Juliana M.; DIGMAYER, Melanie. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em catifeiro. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 34(3), p. 337-344, 2008a.

STREIT JR., Danilo P.; SIROL, Rodolfo N.; RIBEIRO, Ricardo P.; MORAES, Gentil V.; MENDEZ, Lauro V.; WATANABE, A.L. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Braz. J. Biol.**, v. 68(2), p. 373-377, may 2008b.

STREIT JR., Danilo P.; OLIVEIRA, Ana C; RIBEIRO, Ricardo P.; SIROL, Rodolfo N.; MORAES, Gentil V.; GALO, Juliana M.; DIGMAYER, Melanie. Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós criopreservação de *piaractus mesopotamicus*. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.35(2), p. 159 - 167, 2009.

TUSET, V.M.; DIETRICH, G.J.; WOJTCZAK, M.; SLOWINSKA, M.; DE MONSERRAT, J.; CIERESZKO, A. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, Canary Islands, v. 69, p. 1033-1038, jan, 2008.