

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2004) 41:147-153
ISSN printed: 1413-9596
ISSN on-line: 1678-4456

Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa

Comparison of Curimba semen (*Prochilodus lineatus*) induced by pituitary extract from chicken, rabbit or carp

Danilo Pedro STREIT JR.¹;
Gentil Vanini de MORAES¹;
Ricardo Pereira RIBEIRO¹;
Eduardo Shigueiro SAKAGUTI¹;
Ederval Donizeti de SOUZA¹;
Jayme Aparecido POVH¹;
Walangiery CAÇADOR¹

1- Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR

Correspondência para:

DANILO PEDRO STREIT JR.
Universidade Estadual de Maringá
Laboratório de Reprodução Animal
Departamento de Zootecnia
Centro de Ciências Agrárias
Av. Colombo, 5790
87020 - 900 - Maringá - PR
danilostreit@hotmail.com
gvmoraes@uem.br

Recebido para publicação: 06/02/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Resumo

Foram selecionados 48 Curimbás (*Prochilodus lineatus*) e hipofisados com extrato de hipófise de frango (EHF), extrato de hipófise de coelho (EHCo) e o controle com extrato de hipófise de carpa (EHC). Os animais foram induzidos, aleatoriamente, com os tratamentos arranjados em um fatorial de três hormônios e três semanas. Animais tratados com EHF, EHC ou EHCo produziram, em média, 0,65, 0,45 e 0,20 mL de sêmen, respectivamente, havendo diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos com EHF e EHCo, mesmo comportamento verificado para o número médio de espermatozoides totais produzidos. Para os animais tratados com EHCo, houve maior concentração de espermatozoides/mm³ de sêmen quando comparado com os machos induzidos com EHC ($P < 0,05$). Todavia, não houve diferença ($P > 0,05$) quando comparados com os machos induzidos com EHF. *Prochilodus lineatus* induzidos com EHF mostraram motilidade espermática progressiva superior ($P < 0,05$) aos animais induzidos com EHC, porém, *Prochilodus lineatus* induzidos com EHCo apresentaram um comportamento semelhante ($P > 0,05$) aos tratados com EHC ou EHF. Quanto ao vigor espermático, os machos responderam de forma semelhante ($P > 0,05$) para os três indutores utilizados, sendo em média, 2,75 pontos. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o EHF apresentou eficiência semelhante ou melhor do que o tradicional EHC. Entretanto, o EHCo necessita de mais pesquisas, visando testar hipófise de animais mais idosos.

Palavras-chave:

Aquacultura.
Avaliação espermática.
Hipófise.
Indução hormonal.

Introdução

Dentre as espécies brasileiras, a Curimbá (*Prochilodus lineatus*) é, atualmente, uma das mais produzidas¹. O *Prochilodus lineatus* é também, conhecido, popularmente,

como grumataão, curimatá, Curimbá ou curimatã.² É uma espécie reofílica, considerada a mais comum do Pantanal e, reproduz-se na cabeceira dos rios de novembro a janeiro, na época das chuvas³, característica que os tornam importantes em

sistemas de policultivo, pois realizam a limpeza dos tanques.²

Para obtenção de alevinos, destaca-se o uso do hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana), GnRH (Fator Liberador de Gonadotrofina), Antidopaminérgicos (Antagonistas de dopamina) ou associação de GnRH com antidopaminérgicos.⁴

A hipofiseação é simples e prática, o que a torna o método o mais utilizado no mundo.^{5,6} Talvez a principal desvantagem do método de hipofiseação, seja o custo. Soluções que consigam contornar este problema têm sido testadas, como os trabalhos de Nwadike⁷ e Inyang e Hettiarachchi⁸ que utilizaram hipófises de anuros para induzir a desova de catfishes africanos. Pesquisas com hipófises de aves também passaram a ser uma alternativa. Yu et al.⁹ utilizaram hipófises de frango, avestruz, peru, ganso e pato para induzir ovulação em carpa prateada. No Brasil, vários pesquisadores testaram hipófise de aves como em tenca (*Tinca tinca*)¹⁰, em Curimbá (*Prochilodus lineatus*)¹¹, em fêmeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)⁴ e em machos e fêmeas de pacu¹². Hipófises de mamíferos também já foram utilizadas no trabalho de Streit Jr.¹², que testou hipófise de coelhos em machos e fêmeas de pacu.

O objetivo deste trabalho foi avaliar quali-quantitativamente o sêmen do *Prochilodus lineatus*, submetidos a tratamentos com extratos de hipófises de frango ou coelho, em comparação com tratamentos de extrato de hipófise de carpa.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado de dezembro de 2001 a janeiro de 2002, na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM/CODAPAR), Paraná.

Foram selecionados 48 machos de *Prochilodus lineatus* oriundos da estação de piscicultura da UEM e adquiridos junto a produtores da região. Os animais foram selecionados segundo os critérios de Woynarovich e Horváth¹³. A seleção dos exemplares para indução foi efetivada ainda no interior dos viveiros.

No laboratório, os peixes foram identificados na nadadeira dorsal, pesados para determinação da dose hormonal e após acondicionados em tanque de manipulação. Os três tanques de concretos utilizados para a manipulação possuíam capacidade para 2000 litros, dispostos lado a lado, acondicionados sobre o piso da sala de manipulação.

Cada tanque de manipulação continha uma coluna d'água de 50 centímetros, com um fluxo de água constante, com temperatura em torno de 26°C e 4 a 7 mg/L de oxigênio dissolvido, mantido através do fluxo d'água.

Após o processo de seleção, transporte e acomodação dos Curimbás, foi efetuada a indução hormonal (Tabela 1). Em cada tratamento foram induzidos 16 animais.

A temperatura da água foi monitorada de hora em hora com um

Tabela 1

Esquema de aplicação dos extratos de hipófises de carpa, de aves e de coelhos (mg/kg de peso vivo) em *Prochilodus lineatus* administradas em dose única, visando a indução reprodutiva, Maringá, 2002

| SEXO | APLICAÇÃO | EXTRATO DE HIPÓFISE | | |
|-------|-----------|---------------------|--------|--------|
| | | CARPA | FRANGO | COELHO |
| MACHO | ÚNICA | 3,0 | 5,0 | 7,0 |

termômetro de graduação Celsius, com o intuito de obter a unidade térmica acumulada (UTA). Estabeleceu-se 240 UTA como padrão para coleta do sêmen de cada animal.

As hipófises de frango foram obtidas de animais com aproximadamente 45 dias de idade, provenientes da linha de abate de um abatedouro de Maringá. As hipófises de coelhos foram coletadas de animais abatidos na Fazenda Experimental de Iguatemi da UEM. A idade dos coelhos era de 70 dias de vida. A hipófise de carpa foi adquirida no mercado, pronta para ser utilizada.

Para retirar as hipófises efetuou-se um corte que iniciava na região occipital, passando por entre o olho e o ouvido, chegando ao meio da boca, ficando o cérebro do animal e a cela túrcica expostos, de onde a hipófise foi extraída. No caso das aves, o corte foi efetuado com uma faca afiada e, já para os coelhos, com serra fita usada em açougues. A extração das hipófises da cela túrcica foi efetuada utilizando cureta odontológica ou agulhas de injeção de 25x8 mm.

As hipófises de coelhos e de frangos foram processadas e maceradas e, depois de transformadas em extrato, diluídas segundo as recomendações de Woynarovich e Horváth¹³.

Para a coleta dos gametas, o animal foi retirado do aquário, enrolado em uma toalha seca e apoiado sobre uma porção de espuma de densidade 30, em cima da mesa de manipulação. Em seguida, o orifício urogenital e a nadadeira anal foram secos com papel-toalha e o sêmen coletado em um vidro relógio e transferido para seringas de diferentes graduações para determinar o volume.

Os procedimentos realizados para avaliação dos parâmetros quantitativos do sêmen são apresentados a seguir, segundo as recomendações de Sorensen Jr.¹⁴:

Volume: o sêmen foi coletado em seringas graduadas em escala de 0,1 mL.

Concentração de espermatozóides: o sêmen foi diluído em um Becker, utilizando a pipeta de Shalli (0,02 mL) em 40 mL de formol-salina tamponada, resultando a

diluição de 1:2000. Feita a diluição, preencheu-se, por capilaridade, a câmara de Neubauer e, contaram-se os espermatozóides de cinco quadrados do campo de 1 mm². Somando-se os espermatozóides contados nos referidos quadrados e dividindo por 80 quadrados pequenos, multiplicando por 400 quadrados pequenos, pela diluição e pela altura da câmara, obteve-se a quantidade de espermatozóides por mm³.

Motilidade progressiva e Vigor espermático: em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída uma gota de sêmen com oito gotas de água destilada, à temperatura ambiente, levado ao microscópio de contraste de fase em aumento de 40X e avaliado, por método subjetivo, ambas as variáveis. Para variável motilidade progressiva utilizou-se um escore de 0 à 100% e para o vigor espermático um escore de 0 a 5 pontos.

Com os valores dos volumes individuais e da concentração espermática foi calculado o número de espermatozóides totais liberados.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com os três tratamentos arranjados em fatorial de três hormônios e três repetições (semanas), por tratamento. Cada animal foi considerado uma unidade experimental.

O volume de sêmen, concentração de espermatozóides, número de espermatozóides totais, motilidade progressiva e vigor foram analisadas, separadamente, segundo o modelo estatístico, a seguir:

$$Y_{ijk} = m + H_i + S_j + HS_{ij} + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = observação referente ao macho (k), recebendo o hormônio (i) na semana (j);

m = constante geral;

H_i = efeito do hormônio(i);

S_j = efeito da semana(j);

HS_{ij} = interação entre o hormônio (i) e a semana(j);

e_{ijk} = erro aleatório associado à observação

do animal (k) que recebeu o hormônio (i) na semana (j);

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS¹⁵. As variáveis peso, concentração de espermatozoides, volume, número de espermatozoides totais produzidos foram analisadas por meio do procedimento GLM, aplicando teste Tuckey ($p < 0,05$). Para as variáveis motilidade progressiva e vigor espermático foi aplicado a distribuição Gamma com a função de ligação Log e o procedimento de análise GENMOD.

Resultados

O volume de sêmen, concentração e número de espermatozoides observados nos ejaculados obtidos de *Prochilodus lineatus* induzidos com extratos de hipófises de carpa (EHC), coelho (EHCo) ou frango (EHF),

assim como os pesos dos machos, são apresentados na tabela 2.

Não houve diferença entre o volume médio de sêmen oriundo dos animais tratados com EHC e EHF ($P > 0,05$), apesar da quantidade de sêmen produzido pelo EHF ser 30% maior. Por outro lado, foi obtido menor volume de sêmen dos animais tratados com EHCo em comparação aos tratados com EHF e EHC ($P < 0,05$).

Os animais tratados com EHC não apresentaram diferença na concentração espermática em relação aos tratados com EHF ($P > 0,05$). Por sua vez, os animais tratados com EHF, quanto ao parâmetro concentração espermática, não diferiu ($P > 0,05$) dos animais induzidos com EHCo, porém, ao comparar-se os animais tratados com EHC e EHCo observaram-se diferenças ($P < 0,05$).

O número total de espermatozoides

Tabela 2

Volume de sêmen, concentração e número total de espermatozoides obtidos de sêmen colhido de *Prochilodus lineatus* induzidos com extratos de hipófises de carpa (EHC), frango (EHF) e coelho (EHCo), além do peso dos animais induzidos, Maringá, 2002

| Variáveis | Tratamentos | | |
|---|------------------------|------------------------|-----------------------|
| | EHC | EHF | EHCo |
| Peso (Kg) ¹ | 0,25 (16) a | 0,25 (16) a | 0,20 (16) a |
| Volume (mL) | 0,45 ab | 0,65 a | 0,20 b |
| Concentração de espermatozoides /mm ³ | 1,4x10 ⁷ b | 1,8x10 ⁷ ab | 2,0x10 ⁷ a |
| Número totais de espermatozoides liberados no sêmen | 6,7x10 ⁶ ab | 12x10 ⁶ a | 4,9x10 ⁶ b |

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

¹ Os valores entre parênteses significam o número de animais por tratamento

Tabela 3

Médias da motilidade espermática progressiva e vigor espermático, verificados em sêmen de *Prochilodus lineatus* induzidos com extrato de hipófise de carpa (EHC), frango (EHF) e coelho (EHCo), Maringá, 2002

| Variáveis | Tratamentos | | |
|--|-------------|---------|---------|
| | EHC | EHF | EHCo |
| Motilidade espermática progressiva (%) | 50,00 b | 68,20 a | 60,0 ab |
| Vigor espermático (0-5 pontos) | 2,70 a | 2,80 a | 2,70 a |

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

produzidos durante a liberação foi maior ($P < 0,05$) nos animais tratados com EHF em relação aos EHC_o, porém, não diferiu ($P > 0,05$) dos animais tratados com EHC. Por sua vez, animais induzidos com EHC obtiveram comportamento semelhante aos tratados com EHC_o.

Os resultados da motilidade espermática progressiva e do vigor espermático são apresentados na tabela 3.

A motilidade espermática progressiva foi maior ($P < 0,05$) no sêmen de animais induzidos com EHF em comparação com aqueles tratados com EHC, mas não diferiu daqueles tratados com EHC_o. Entretanto, o comportamento dos espermatozoides induzidos com EHC foi similar ($P > 0,05$) aos dos induzidos com EHC_o. O vigor espermático foi semelhante nos três tratamentos.

Discussão

Análise da qualidade do sêmen de *Prochilodus lineatus* revelou haver diferenças entre os tratamentos utilizados.

O volume de sêmen produzido pelo *Prochilodus lineatus*, induzidos com EHF foi 70% maior do que aqueles obtidos de animais induzidos com EHC_o e 30% maior que os induzidos com EHC. A eficiência do EHF na indução do *Prochilodus lineatus* pode estar relacionado com a presença do GtH-I (hormônio gonadotrófico-I) e GtH-II (hormônio gonadotrófico-II) ou hormônios similares encontrado nas hipófises de frango. O α GnRh (fator liberador de gonadotrofina de frango) é um dos quatro principais fatores liberadores de gonadotrofinas encontrados no hipotálamo de peixes¹⁶; presume-se, então, haver grande quantidade de receptores para este α GnRh que, por sua vez, estimulará a liberação de gonadotrofinas GtH-I e GtH-II.

A concentração de espermatozoides varia entre as espécies de peixes. Pérez et al.¹⁷ induziram machos de *Anguilla anguilla* com hCG (gonadotrofina coriônica humana) e constataram concentrações de 1,0 a 14×10^9

espermatozoides/mL, ao avaliarem a qualidade do sêmen desta espécie. Tvedt et al.¹⁸, trabalhando com o linguado (*Hippoglossus hippoglossus*), registraram concentrações que variaram de $1,95 \times 10^{11}$ até $6,13 \times 10^{11}$ espermatozoides/mL, após a indução com GnRH(a) (fator liberador de gonadotrofina análogo). Neste trabalho, a concentração média de espermatozoides nos três hormônios testados, variou de $1,4 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^7$ espermatozoides/mm³. Embora o desempenho tenda a ser melhor nos animais induzidos com EHC_o, estes machos produziram menor volume de sêmen, o que pode ter levado a maior concentração de espermatozoides. Porém, estes valores encontrados nos estudos do *Prochilodus lineatus* são semelhantes ao de *Piaractus mesopotamicus* induzidos com hCG por Silveira et al.¹⁹, que obtiveram 28×10^6 espermatozoides/mm³.

Machos induzidos com EHF apresentaram maior volume e maior concentração de espermatozoides, logo, mostraram melhor desempenho quanto ao número de espermatozoides totais encontrados no sêmen liberados se comparado com EHC_o e EHC. Possivelmente, a concentração de gonadotrofinas (I e II) existentes no EHF foi maior do que nos outros indutores ou receptores gonadotróficos existentes nas gônadas do *Prochilodus lineatus*, são mais suscetíveis à ação destas gonadotrofinas existentes no EHF. Redding e Patino²⁰ afirmaram que o aumento do volume de sêmen, está relacionado ao aumento na concentração sanguínea de gonadotrofinas. Já Van Der Kraak et al.¹⁶ chamaram atenção para o fato de existir especificidade para gonadotrofinas de diferentes origens. Bedore²¹ verificou aumento de cinco vezes na produção de células espermáticas quando induziu *Piaractus mesopotamicus* com EHC em relação as animais não induzidos. Porém, Pardo-Carrasco²², trabalhando com *Brycon siebenthalae* induzidos com GnRH, registrou crescimento de 10 vezes na produção de sêmen, mas não ocorreu aumento no número de espermatozoides totais

produzidos, quando comparado ao animais do controle, sem indução.

A motilidade espermática progressiva e o vigor espermático apresentaram comportamento distintos quanto aos tratamentos. O vigor espermático parece não ter sofrido influência dos agentes indutores utilizados, situando-se em torno de 2,75 pontos. Por outro lado, a motilidade espermática progressiva variou de acordo com o agente indutor utilizado. O fato, eficiência menor para o EHC comparado ao EHF, também pode estar correlacionado com uma quantidade menor de hormônios gonadotróficos presentes neste extrato ou mesmo uma quantidade menor de receptores gonadais existentes nas gônadas de *Prochilodus lineatus* para

gonadotrofinas existentes no EHC. Este fato difere do que Streit Jr. (2002)¹⁸ encontraram em *Piaractus mesopotamicus* utilizando-se os mesmos indutores gonadais EHC, EHF e EHCo, onde não foi verificado diferença entre os tratamentos quanto à motilidade espermática progressiva, tendo ficado em torno de 75%.

Conclusões

Nas condições em que foi realizado o experimento, conclui-se que o EHF apresentou eficiência semelhante e, por vezes, melhor do que o tradicional EHC. Já, EHCo necessita ser melhor estudado.

Abstract

Forty eight curimba (*Prochilodus lineatus*) were selected and hypophyised with broiler chicken hypophysis extract (BCHE), rabbit hypophysis extract (RHE) or carp hypophysis extract (CHE) as a control. The animals were randomly induced with treatments arranged in one factorial of three hormones and three weeks. Animals treated with BCHE, CHE and RHE produced an average of 0.65, 0.45 and 0.20 mL of semen, respectively. Therefore, difference ($P < 0.05$) between BCHE and RHE treatments was observed. The same behavior was verified for total spermatozoon average number produced. Animals treated with RHE presented higher semen concentration (spermatozoon/ mm^3) than males induced with CHE ($P < 0.05$). However, there was no differences ($P > 0.05$) when compared with males induced with BCHE. *Prochilodus lineatus* induced with BCHE showed higher progressive spermatic motility ($P < 0.05$) than animals induced with CHE. However, *Prochilodus lineatus* induced with RHE exhibited similar behavior ($P > 0.05$) of animals treated with CHE or BCHE. Animals treated with BCHE, RHE or CHE had same spermatic vigor ($P > 0.05$), with an average of 2.75 points. According to these results it is possible to concluded that BCHE showed the same efficiency or it was even better than traditional CHE when used to induced males. However, more research effort with RHE is necessary, particularly with older animals hypophysis.

Key-words:

Aquaculture.
Spermatic evaluated.
Hypophysis.
Hormones induced.

Referências

1. CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. cap 9, p. 71-96.
2. SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2000. 49 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2000.
3. BRITSKI, H. A. **Peixes do pantanal**. Manual de identificação. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. 184 p.0
4. BARROSO, R. M. **Utilização do extrato bruto de**

- hipófise de frango de corte (*Gallus domesticus*) na indução da maturação final oocitária e da desova em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (HOLMBERG, 1887).** 1999. 44 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1999.
5. CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. P. **Dicas em piscicultura; perguntas e respostas.** Botucatu: Santina Gráfica Editora, 2000. 247 p.
 6. PILLAY, T. V. R. **Reproduction and genetic selection.** In: PILLAY, T. V. R. **Aquaculture: principles and practices.** Oxford: Fishing News Books, Blackwell Scientific, 1990. p. 156-173.
 7. NWADUKWE, F. O. Inducing oocyte maturation, ovulation and spawning in the African catfish, *Heterobranchus longifilis* Valenciennes (Pisces: Clariidae), using frog pituitary extract. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 24, n. 6, p. 625-630, 1993.
 8. INYANG, N. M.; HETTIARACHCHI, M. Efficacy of human chorionic gonadotropin (HCG) and crude pituitary extract of fish and frog in oocyte maturation and ovulation in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 and *Clarias anguillaris* L. 1762. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, n. 2, p. 245-258, 1994.
 9. YU, J. Y. L. et al. Comparative effects of avian and piscine gonadotrophins on gonadal steroidogenesis, and of avian and piscine pituitaries on induction of spermiation and ovulation in the loach and white silver carp. **Aquaculture**, v. 135, n. 1, p. 59-72, 1995.
 10. AMARAL JÚNIOR, H. Utilização de extrato hipofisário de galinha para a indução a desova de tenca. Opção de banco de hipófise para o pequeno produtor rural. In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 6., 1995, Ibirubá. **Anais...** Ibirubá: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p. 154-162.
 11. SILVA, J. A. et al. Utilização de extrato cru de hipófise de frangos (*Gallus domesticus*) como indutor de desova em curimatá (*Prochilodus scrofa*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 30-32, 1997.
 12. STREIT Jr., D. P. **Extrato de hipófise de frango e de coelho como indutores gonadais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) macho e fêmea, em comparação com o extrato de hipófise de carpa.** 2002. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
 13. WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão.** Brasília: Escopo. 1983. 220 p.
 14. SORENSEN Jr., A. M. **A laboratory for animal reproduction.** 4. ed. Massachusetts: American Press, 1979. 153 p.
 15. SAS Institute Inc. **SAS technical report: Release 6.07.** Cary: NC, 1992.
 16. VAN DER KRAAK, G.; CHANG, J. P.; JANZ, D. M. Reproduction. In: EVANS, D. H. **The physiology of fishes.** 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 465-488.
 17. PÉREZ, L. et al. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 6, p. 1488-1504, 2000.
 18. TVEDT, H. B.; BENFEY, T. J.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; POWER, J. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. **Aquaculture**, v. 194, n. 1, p. 191-200, 2001.
 19. SILVEIRA, W.F. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 1-13, 1990.
 20. REDDING, J.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. **The physiology of fishes.** Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 503-534.
 21. BEDORE, A. G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piraicanjuba (*Brycon orbignianus*).** 1999. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
 22. PARDO-CARRASCO, S. C. **Reprodução induzida do yamú, *Brycon siebenthalae* (Pisces Characiforme).** 2001. 62 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.