

SÊMEN DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) CRIOPRESERVADO COM DILUENTES UTILIZADOS PARA SÊMEN DE SUÍNOS

DANILO PEDRO STREIT JR.,¹ CELSO BENITES,² GENTIL VANINI DE MORAES,³ RICARDO PEREIRA RIBEIRO,³ EDUARDO SHIGUEIRO SAKAGUTI³ E RIVAIL FERREIRA CALDIERI⁴

-
1. Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – <danilostreit@hotmail.com>;
2. Professor MSc. do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) – <benites@nin.ufms.br>;
3. Professor doutor do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – <gvmoraes@uem.br>; <rpribeiro@uem.br>;
4. Aluno especial de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

RESUMO

Sêmen de *Piaractus mesopotamicus* foi conservado no diluente regularmente utilizado para peixes, constituído de 20 % de gema de ovo + 5 % glicose, com 10 % de dimetil sulfoxido (DMSO) (controle) e quatro soluções utilizadas em diluição de sêmen de suínos: Zorlesco modificado (ZOR), BTZOR (desenvolvido na Universidade Estadual de Maringá), Andro-Hepes e Beltsville Thawing Solution (BTS), todos acrescidos de 0,16g de KCl mais 10 % de glicerol. A motilidade progressiva e o vigor espermático foram superiores no diluente gema de ovo+glicose (16% e 2,55 pontos, respectivamente) ($P>0,05$) aos diluidores ZOR, BTZOR, Andro-Hepes e BTS (0,25% e 0,34

pontos, respectivamente), porém inferior ($P<0,05$) ao sêmen *in natura*, (75,00% e 3,40 pontos, respectivamente). A morfologia espermática não apresentou diferença entre os cinco diluentes, mas o percentual médio de espermatozoides normais e de patologias secundárias foi menor ($P<0,05$), após a descongelação, nos cinco diluentes crioprotetores em relação ao sêmen *in natura*. As patologias com maior incidência foram cauda dobrada e cabeça solta (patologias secundárias) e cauda enrolada e curta (patologias primárias). Os meios para sêmen de suíno testados neste experimento não se apresentaram eficientes na congelação do sêmen de *P. mesopotamicus*.

PALAVRAS-CHAVE: Aquacultura, crioprotetor, diluidores, dimetil sulfoxido, glicerol.

ABSTRACT

SEMEN OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*) CRIOPRESERVED USED DILUENT FOR SWINE SEMEN

The *Piaractus mesopotamicus* semen was conserved in the diluent regularly used for fish, constituted of 20 % egg yolk + 5 % glucose, with 10% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (control) and four solutions used in dilution of swine semen: modified Zorlesco (ZOR), BTZOR (developed in the Universidade Estadual de Maringá), Andro-Hepes and Beltsville Thawing Solution (BTS), all added of 0.16 g of KCl more 10% of glycerol. The progressive motility and the spermatic vigor were superior in the diluent egg+glucose yolk (16% and 2.55 points, respectively) ($P>0.05$) to the diluent's ZOR, BTZOR, Andro-Hepes and BTS (0.25% and 0.34 points, respectively), however above

($P<0.05$) of values observed to the semen "in nature", (75.0% and 3.40 points, respectively). The spermatozoa morphology was not different among five diluents, but the percentile medium of normal spermatozoons and with secondary pathologies was smaller ($P<0.05$) after the frozen, for the five diluents cryoprotectant in relation to the semen "in nature". The pathologies with larger incidence were shoehook and tailless (secondary pathologies) and coiled and short tail (primary pathologies). The diluents used for swine semen tested in this experiment, were not efficient in semen freezing of *P. mesopotamicus*.

KEY WORDS: Aquaculture, cryoprotectant, diluents, dimethyl sulfoxide, glycerol.

INTRODUÇÃO

Bioteχνologias, como a criopreservação, que permitam a otimização na utilização de sêmen de inúmeras espécies de peixes são constantemente pesquisadas. A criopreservação de sêmen de peixes, para TIERSH & MAZIK (2000), contribuem na operacionalização e flexibilização dos programas de reprodução.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), por apresentar rusticidade, crescimento precoce e hábito alimentar onívoro (CASTAGNOLLI & ZUIM, 1985), mostra grande aceitação na piscicultura brasileira. O aumento na produção desta espécie, no Brasil, justifica a aplicação de biotécnicas, como a criopreservação de sêmen, em programas de reprodução desta espécie.

A qualidade dos espermatozóides criopreservados é de fundamental importância para o sucesso na fertilização (JOHNSON et al., 2000). A eficiência de fertilização do espermatozóide pós-criopreservação, para CLOUD (2000), está diretamente relacionada com a composição da solução diluidora. Para o diluidor prolongar a vida de espermatozóide *in vitro*, é necessário possuir a propriedade de reduzir a atividade metabólica dos espermatozóides, seja por inibidores químicos ou por redução de temperatura (JOHNSON et al., 2000). De acordo com MORRIS & WATSON (1984), as injúrias causadas pela baixa temperatura sobre os espermatozóides são classificadas em duas categorias: (a) as decorrentes diretamente do resfriamento ou pelo choque frio, em consequência do rápido resfriamento; (b) e as injúrias causadas indiretamente e independente da taxa de resfriamento e que vão se manifestar após períodos extensos em baixas temperaturas.

A baixa toxicidade e a alta solubilidade na água são requisitos essenciais para um agente químico ser considerado crioprotetor (CHAO & LIAO, 2001). Desse modo, crioprotetores como o glicerol, metanol, dimetil sulfóxido (DMSO), etileno-glicol, sacarose entre outros são usados com sucesso na criopreservação de sêmen de inúmeras espécies de peixes (DENNISTON et al., 2000; TIERSCH et al., 2000; CAROLSFELD et al., 2003).

Basicamente as soluções diluidoras para sêmen de suíno, como Beltsville Thawing Solution (BTS), Andro-Hepes, Zorlesco modificado (ZOR), são compostas por glicose e combinações de sais, como citrato e bicarbonato de sódio. Todavia, as concentrações de cada componente é o que determina o seu custo e eficiência, como se refere WOELDERS (1992) com relação ao BTS, sugerindo ser este o diluidor para sêmen preferido na inseminação artificial de suínos, por conter um número limitado de ingredientes e conseqüentemente um menor custo. O sêmen de suíno diluído em ZOR e utilizado na inseminação de leitoas apresentou melhores índices reprodutivos, como menor índice de retorno do cio e maior número médio de leitões nascidos, do que os semens diluídos em BTS e BTZOR (VASCONCELOS et al., 2001).

O objetivo deste experimento foi comparar quatro diluidores na congelação do sêmen de suínos – BTS, Andro-Hepes, ZOR e o meio desenvolvido no Laboratório da Universidade Estadual de Maringá (BTZOR) – e o diluente mais utilizado na congelação de sêmen de peixes neotropicais (controle) na conservação do sêmen de pacu.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se experimento na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, juntamente com o Laboratório de Reprodução Animal da UEM.

Os animais foram selecionados no viveiro de reprodutores, após liberação de sêmen a uma leve compressão abdominal (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983) e, em seguida, levados ao laboratório para serem induzidos à reprodução. No total selecionaram-se doze machos de *P. mesopotamicus*.

Efetuiu-se a indução hormonal em dose única de solução com 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg, mantendo-se os peixes em dois aquários de manipulação (dois animais em cada/por repetição) com uma coluna d'água de 50 centímetros e fluxo constante, apresentando de 5 a 6 mg/L de oxigênio dissolvido, à temperatura de 25±1,5°C.

Colheu-se o sêmen de cada animal por meio de uma seringa plástica de 3 mL do orifício urogenital, após leve massagem abdominal, previamente seco com papel toalha macia, evitando-se a contaminação com água, urina e fezes, seguindo as recomendações de BILLARD et al. (1995). Caso ocorresse a suspeita de contaminação, o sêmen era descartado e outro animal e uma nova seringa eram utilizados.

Realizaram-se as análises de motilidade progressiva, vigor espermático e morfologia dos espermatozoides com o sêmen fresco e pós-descongelado. Sêmen de animais em que os espermatozoides possuíam motilidade abaixo de 70% foram descartados. Os procedimentos para análise do sêmen são descritos a seguir, de acordo com SORENSEN Jr. (1979), adaptados para peixe.

Quanto à motilidade progressiva e vigor espermático, em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída uma gota sêmen com oito gotas de água, levando-se ao microscópio de contraste de fase com objetiva de 40x e avaliadas, por método subjetivo, ambas as variáveis. Para motilidade progressiva, utilizou-se escore de 0% a 100% e, para vigor espermático, escore de 0 a 5 pontos. Efetuou-se a diluição do sêmen com água destilada à temperatura ambiente.

No que se refere à morfologia dos espermatozoides, para esta análise, por amostra de sêmen, produziram-se dois esfregaços com sêmen diluído em solução formol-salina tamponada, na proporção de 1:2000 (sêmen:solução diluente), os quais foram corados pelo método de Rosa Bengala (COHN, 1918) secos e levados ao microscópio de contraste de fase para leitura em objetiva de 40x. Contou-se de 200 a 230 espermatozoides por lâmina, classificando-se as patologias em primárias e secundárias, segundo HERMAN et al. (1994).

Após coleta e análise de cada amostra de sêmen, realizaram-se os procedimentos para criopreservação. Cada amostra de sêmen foi dividida em cinco alíquotas de mesmo volume e diluídas na proporção de 1:3 (sêmen/solução crioprotetora) nas cinco soluções crioprotetoras, à temperatura ambiente (Tabela 1).

As amostras homogêneas foram envasadas em *paillettes* (marca, IMV) de 0,5 mL identificados e colocados em *globlets* plásticos, fixados nas *racks* e, em seguida, alocados no *canister* de um botijão com vapor de nitrogênio do tipo *dry shipper* (Taylor-Wharton, modelo CP 300 dry shipper), a -16°C estabilizado. Drenou-se o nitrogênio líquido, em excesso, do botijão de nitrogênio antes de ser iniciado o processo de resfriamento das amostras de sêmen.

Após 24 horas no botijão de resfriamento *dry shipper*, as *racks* contendo as amostras de sêmen resfriadas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido para estocagem (MVE, modelo CP-34) à -196°C, onde permaneceram por noventa dias, sendo verificado, periodicamente, o nível de nitrogênio.

Completado o tempo de estocagem estabelecido, os *paillettes* foram descongelados, um a um, através da imersão em banho-maria (45°C), durante cinco segundos, sendo previamente friccionados entre as mãos por três vezes seguidas para depois serem avaliados os parâmetros espermáticos previamente descritos – motilidade progressiva, vigor espermático e morfologia dos espermatozoides.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, testando-se doze vezes (tempo) as cinco soluções crioprotetoras, e testando-se doze vezes (tempo) o sêmen *in natura* quanto à sua efetividade na criopreservação dos espermatozoides através das variáveis motilidade progressiva, vigor espermático e morfologia, considerando-se cada animal uma unidade experimental. O modelo estatístico proposto foi:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + e_{ijk}$$

Y_{ij} = observação do animal (k) que recebeu o tratamento (i) no tempo (j);

μ = constante geral;

S_i = efeito do tratamento (i);

T_j = efeito do tempo (j);

ST_{ij} = interação entre o tratamento (i) com o tempo (j);

e_{ij} = erro aleatório associado à observação do animal (k) no tempo (j) que recebeu o tratamento (i).

As variáveis motilidade progressiva, vigor espermático e morfologia dos espermatozoides foram comparadas por meio do teste de Tukey com

nível de 5% de significância. Para todas as análises realizadas utilizou-se o programa estatístico SAS (1992).

TABELA 1. Composição das soluções diluidoras gema de ovo+glicose+DMSO (controle), BTS, ZOR, BTZOR e Andro-Hepes acrescidos do agente crioprotetor, utilizados para congelar sêmen do *P. mesopotamicus*.

Componentes	Soluções diluidoras				
	Gema de ovo+glicose ⁶	BTS ⁷	ZOR ⁸	BTZOR ⁹	Andro-Hepes
Gema de ovo (ml) ¹	20				
Glicose (g)	5	37	11,5	24	26
Citrato de sódio diidratado (g)		6	11,65	4,8	8,0
Bicarbonato de sódio (g)		1,25	1,75	1,50	1,2
EDTA ² (g)		1,25	2,35	1,80	2,4
TRIS ³ (g)		-	6,50	3,50	
Cloreto de potássio (g)		0,91	0,16	0,56	
Penicilina G sódica (g)		1,00	1,00	1,00	
Diidrosteptomicina (g)		1,00	1,00	1,00	
Ácido cítrico (g)		-	4,10	2,00	
BSA-V ⁴ (g)		-	5,00	3,00	2,5
Cisteína (g)		-	0,07	0,04	
Hepes (g)					9,0
Água deionizada (ml)	100	1000	1000	1000	1000
Glicerol (ml)		100	100	100	100
DMSO ⁵ (ml)	10				

1. Sem a camada perivitelínica; 2. EDTA: etilenodiamino teracetato; 3. TRIS: hidróxi-metil-aminometano; 4. Soro fetal bovino; 5. Dimetil-sulfóxido; 6. World Fisheries Trust; 7. Beltsville Thawing Solution; 8. Zorlesco modificado; 9. Meio desenvolvido no Laboratório da UEM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum dos meios diluidores para suínos testados neste experimento – BTS, ZOR, BTZOR e Andro-Hepes – proporcionaram valores superiores a 0,27% para a motilidade progressiva e 0,34 pontos para o vigor espermático, significativamente ($P < 0,05$) inferior ao controle (gema de ovo + glicose + DMSO), em que a motilidade progressiva e o vigor espermático médio foram 16,12% e 2,55 pontos respectivamente (Tabela 2). A motilidade progressiva de 16,12% obtida no meio diluidor controle foi inferior aos 52% encontrados por BEDORE

(1999), em estudo de sêmen de *P. mesopotamicus*, utilizando o mesmo meio para diluir o sêmen. Considerando-se o sêmen resfriado a 4°C por 24 horas em BTS associado ao DMSO de espécies como *P. mesopotamicus* (MILIORINI et al., 2002), *Leporinus obtusidens* (MURGAS et al., 2002) e *Prochilodus lineatus* (FRANCISCATTO et al., 2002), a motilidade média obtida foi de 62,50%; 85,00% e 92,00%, respectivamente. A correlação dos resultados obtidos neste experimento com os citados antes sugere a hipótese de que o glicerol te-

na sido a causa da baixa motilidade e vigor espermático observados pós-descongelamento com o sêmen de *P. mesopotamicus* congelado em BTS.

Muito embora o glicerol já tenha sido detectado no plasma seminal de alguns teleosteos, e daí a sua utilização como crioprotetor de sêmen de peixes de clima frio (CIERESZKO et al., 2000), os dados deste trabalho demonstram que este crioprotetor não

foi eficiente na manutenção das características seminais do sêmen de *P. mesopotamicus*. CAROLSFELD et al. (2003) sugerem, para congelamento do sêmen de cinco espécies de Caracidae, dentre elas, o *P. mesopotamicus*, o dimetil sulfoxido (DMSO) como o crioprotetor, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

TABELA 2. Médias e erro padrão de motilidade progressiva e vigor espermático, verificados em sêmen de *P. mesopotamicus* *in natura* e pós-descongelamento nas soluções crioprotetora gema de ovo-glicose, BTS, ZOR, BTZOR e Andro-Hepes.

Tratamentos	Parâmetros qualitativos	
	Motilidade progressiva (%)	Vigor espermático (pontos)
<i>In natura</i>	75,00±0,77A	3,40±0,12A
Gema de ovo+glicose	16,12±0,77b	2,55±0,12b
BTS ¹	0,23±0,77c	0,27±0,12d
ZOR ²	0,32±0,77c	0,42±0,12c
BTZOR ³	0,27±0,77c	0,45±0,12c
Andro Hepes	0,15±0,77c	0,25±0,12c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05);

1. Beltsville Thawing Solution; 2. Zorlesco modificado; 3. Meio desenvolvido no Laboratório da UEM.

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos com congelamento de sêmen de peixes com os meios diluidores ZOR, BTZOR e Andro-Hepes, grande parte de seus componentes é comumente encontrada compondo meios para congelamento de sêmen de peixes. O Tris (Hidroximetil aminometano), juntamente com o cloreto de potássio (KCl), compõem meios eficientes na criopreservação do sêmen de esturjão siberiano (*Acipenser baeri*) (GLOGOWSKI et al., 2002). Do mesmo modo, o KCl, o Hepes e o soro albumina de bovino (BSA) fazem parte de um diluidor amplamente utilizado em salmão, com o qual LAHNSETEINER et al. (1996a, b; 1997) desenvolveram estudos com criopreservação do sêmen desta espécie. De todo modo, JOHNSON et al. (2000) afirmaram que os componentes constituintes de um meio diluente são importantes para assegurar o pH, força iônica, tipo de íons e pressão osmótica do sêmen de cada espécie animal. Assim sendo, as concentrações dos sais presentes nos meios para suínos podem ter sido prejudiciais aos espermatozoides de peixes.

Assim como não houve diferença significativa entre tratamentos e o controle (P>0,05) em relação ao percentual de espermatozoides normais, com relação à presença de patologia primárias e secundárias também não ocorreram (P>0,05) diferenças entre os percentuais de patologias primárias. No controle ocorreu tendência de média mais favorável em relação aos tratamentos, em ambas as variáveis. No entanto, no sêmen *in natura* verificaram-se índices percentuais maiores (P<0,05) de espermatozoides normais e menores (P<0,05) de patologias primárias em relação a todos os tratamentos testados, inclusive ao controle (Tabela 3). Com relação às patologias secundárias, também não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos e também em relação ao controle. Todavia, os índices médios obtidos para todos os tratamentos e o controle após a descongelamento foram menores (P<0,05) que o observado no sêmen *in natura* (Tabela 3).

Segundo LAHNSTEINER et al. (1996b), a formação de cristais de gelo intracelular e a instabilidade na membrana celular causaram também instabi-

lidade na osmorregulação das células espermáticas, provocando a presença de 16% de espermatozóides normais, observado em sêmen de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). No presente trabalho com *P. mesopotamicus*, os valores percentuais médios observados foram menores em todos os tratamentos – BTS (10,99 %); ZOR (10,79 %), BTZOR (10,83 %) e Andro-Hepes (9,65 %) e controle (12,79 %). TADDEI et al. (2001), trabalhando com *Diplodus puntazzo*, constataram que a osmorregulação celular pode ser prejudicada quando há exposição dos espermatozóides em soluções crioprotetoras, resultando primeiro no inchamento da cabeça ou da cauda do espermatozóide e em um segundo momento causar injúrias em organelas intracelulares. Este quadro, de acordo com os autores citados, pode determinar a

perda de funcionalidade da mitocôndria e efusão da cromatina nuclear, resultando em espermatozóides defeituosos ou mortos. Isso pode ser aplicado neste estudo, a fim de se elucidar o número elevado de espermatozóides com patologias primárias, após sofrerem a exposição às cinco soluções diluídas para posterior criopreservação. Para TADDEI et al. (2001), as injúrias nos espermatozóides são motivadas pela exposição à solução crioprotetora e/ou à baixa temperatura do processo de criopreservação, especialmente no estágio de pré-congelamento. Os espermatozóides, quando submetidos à criopreservação, estão sujeitos ao estresse resultante da interação água e solução, que surge pela formação de cristais de gelo (HOLT, 2000), podendo causar dano estrutural ou até mesmo a morte das células espermáticas.

TABELA 3. Médias percentuais e erro padrão de espermatozóides normais e com patologias primárias e secundárias de *P. mesopotamicus*, avaliados *in natura* e após criopreservado nos meios gema de ovo+glicose, BTS, ZOR, BTZOR e Andro-Hepes.

Tratamentos	Espermatozóides		
	Normais	Patologias primárias	Patologias secundárias
<i>In natura</i>	20,39±1,26a	36,15±1,49b	43,46±1,43a
Gema de ovo+glicose	12,79±1,26b	49,99±1,49a	37,29±1,43b
BTS ¹	10,99±1,26b	52,48±1,49a	36,53±1,43b
ZOR ²	10,79±1,26b	52,44±1,49a	36,70±1,43b
BTZOR ³	10,83±1,26b	52,03±1,49a	37,14±1,43b
Andro-Hepes	9,65±1,26b	50,79±1,49a	39,56±1,43b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença (P<0,05);

1 Beltsville Thawing Solution; 2. Zorlesco modificado; 3. Meio desenvolvido no Laboratório da UEM.

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 freqüentes. As anormalidades encontradas neste estudo parecem ser as mais corriqueiras, mesmo nos casos em que o sêmen foi avaliado *in natura*. Em sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*), estudado por KAVAMOTO et al. (1999), as patologias espermáticas mais freqüentes foram cauda dobrada, enrolada e solta. Em

outro estudo, também com *P. lineatus*, STREIT et al. (2003) observaram as patologias cauda dobrada, solta, enrolada e quebrada e cabeça solta como as mais freqüentes. Não existem citações sobre análises de patologias de sêmen de peixe efetuadas após a descongelamento, através do método de preparação de esfregaços. Mas o COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (1998) destaca este método como fator importante na avaliação qualitativa do sêmen de mamíferos.

A elevada presença de espermatozóides com diferentes patologias pode ser atribuída à exposição destes à solução crioprotetora e à congelamento dos

espermatozoides. Em mamíferos, de acordo com HERMAN et al. (1994) e HAFEZ & HAFEZ (2000), de um modo geral, as patologias secundárias, como cauda quebrada e solta, além de cabeça solta, podem estar relacionadas à preparação dos esfregaços, e as anormalidades primárias estão relacionadas às falhas durante a espermatogênese. Entretanto, para peixes, a origem de tais patologias são desconhecidas, sendo possível, portanto, apenas supor a mesma origem.

CONCLUSÃO

Os meios BTS, ZOR, BTZOR e Andro-Hepes em conjunto com o crioprotetor glicerol não foram efetivos na manutenção das características espermáticas, como motilidade progressiva e vigor espermático. Quanto à morfologia dos espermatozoides, não houve diferença significativa no aumento ou diminuição das patologias entre os tratamentos, mas ocorreu uma redução no percentual de espermatozoides normais.

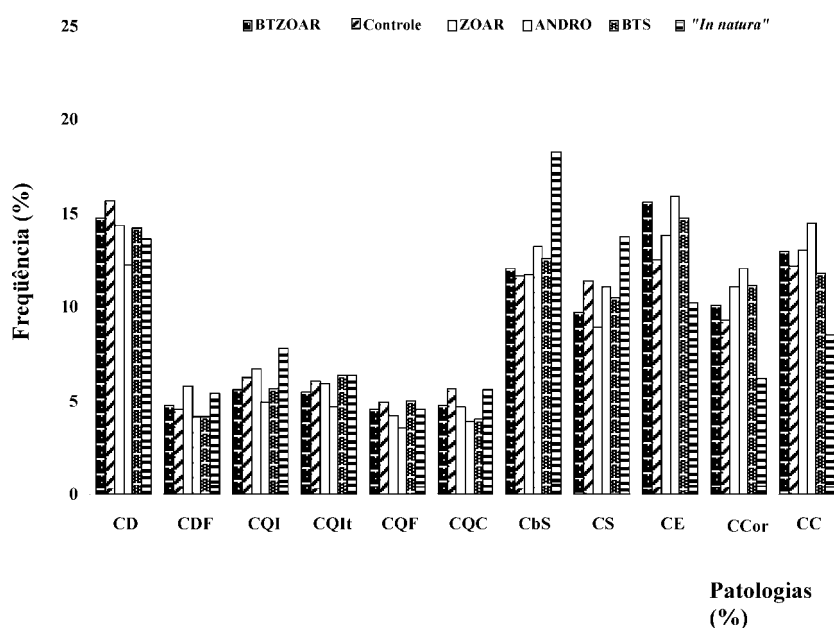


FIGURA 1. Frequências (%) de patologia verificadas em espermatozoides de *P. mesopotamicus*, após a descongelação, utilizando-se como diluidores BT, ZOAR, Andro-Hepes, BTS, além do sêmen *in natura*. Patologias: cauda dobrada (CD), cauda dobrada parte final (CDF), cauda quebrada parte inicial (CQI), cauda quebrada parte intermediária (CQIt), cauda quebrada parte final (CQF), cauda quebrada junto à cabeça (CQC), cabeça solta (CbS), cauda solta (CS), cauda enrolada (CE), cauda corrugada (CCor) e cauda curta (CC).

REFERÊNCIAS

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

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

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Montreal, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 5, n.1, p.1-2, único, 1985.

CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amesterdan, v. 197, n. 1, p. 161-189, jun. 2001.

- CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 20-48.
- CLOUD, J. G. Extender solution for sperm of salmonid fishes. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.282-283.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- CONN, H. J. The microscopic study of bacteria and fungi in soil. **Technology Bulletin**, New York, v. 5, n. 1, p. 64, 1918.
- DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 59-74.
- FRANCISCATTO, R. T.; MURGAS, L. S. D.; MILIORINI, A. B. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, jul.-set. 2002.
- GLOGOWSKI, J.; KOLMAN, R.; SZCZEPKOWSKI, M. et al. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. **Aquaculture**, Amesterdan, v. 211, n. 1-4, p. 367-373, ago. 2002.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippicott Williams and Wickins, 2000.
- HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **Of dairy and beef cattle**. 8. ed. Dauville: Interstate Publishers Inc., 1994.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Londres, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, ago. 2000.
- JOHNSON, L. A. Lessons from the cryopreservation livestock sperm. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 383-387.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Londres, v. 62, n. 1-3, p. 143-172, ago. 2000.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25 p. 61-66, 1999.
- LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). **Aquaculture**, Amesterdan, v. 144, n. 1-3, p. 265-274, set. 1996.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. et al. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 58, n. 3, p. 149-159, jul. 1996.
- LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T., PATZNER, R. A. Methanol as Cryoprotectant and the suitability of 1.2 mL and 5 mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Londres, v. 28, n. 6, p. 471-479, jun. 1997.

- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, jul.-set. 2002.
- MORRIS, G. J.; WATSON, P. F. Cold shock injury - a comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, Londres, v. 5, n. 6, p. 352-372, nov.-dez. 1984.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B. et al. Viabilidade seminal da piapara (*leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, jul.-set. 2002.
- SAS Institute Inc. **SAS technical report. Release 6.07**. Cary: NC, 1992.
- SORENSEN Jr., A. M. **A laboratory for animal reproduction**. 4. ed. Massachusetts: American Press, 1979.
- STREIT Jr., D. P.; MORAES, G. V.; POVH, J. A. et al. Morphopatologia evaluation of curimba *Prochilodus lineatus* semen induced with broiler chicken and rabbit hypophysis extract. In: WORLD AQUACULTURE 2003, Salvador, Brazil. **Proceeding...** Salvador, 2003. p. 759.
- STREIT Jr.; D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P. et al. Comparação do sêmen de curimba (*prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 147-153, 2004.
- TADDEI, A. R.; BARBATO, F.; ABELLI, L. et al. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). **Cryobiology**, v. 42, n. 4, p. 244-255, jun. 2001.
- TIERSCH, T. R.; FIGIEL Jr., C. R.; WAYMAN, W. R. et al. Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 117-122.
- TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000.
- VASCONCELOS, A. M. M. A.; MORAES, G. V.; MOREIRA, I. et al. Efeito do sêmen resfriado e diluído em Beltsville Thawing Solution, Zorlesco-modificado e BTZOR no desempenho de fêmeas suínas inseminadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 402-408, 2001.
- WOELDERS, H. Maintaining quality of boar sperm during storage and transportation. **Pigs Misset**, v. 8, n. 1, p. 22-23, 1992.
- WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo, 1983.