

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA COLORAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES*

Danilo Pedro Streit Jr.
Gentil Vanini de Moraes
Ricardo Pereira Ribeiro
Jayme Aparecido Povh
Ederval Donizeti de Souza
Carlos Antonio Lopes de Oliveira

STREIT-JR¹, D.P.; MORAES², G.V.; RIBEIRO³, R.P.; POVH⁴, J.A.; SOUZA⁵, E.D.; OLIVEIRA³, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(2): p. 157-162, 2004.

RESUMO: A análise da morfologia dos espermatozoides do sêmen colhido de 30 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) consistiu de três soluções fixadoras: formol salina tamponada (FS), citrato sódico diidratado a 3% (CS) e água destilado (Ag) e para corar as células espermáticas três corantes: Vermelho Congo (VC), Rosa Bengala (RB) e Williams-modificado (WM). As combinações de corantes e soluções fixadoras utilizadas foram: RB X FS, WM X FS, VC X FS, VC X Ag, WM X Ag, WM X CS e VC X CS. Na avaliação dos esfregaços levaram-se em consideração as alterações anatômicas, a eficiência do corante, a aglutinação e a sujidade. Quando o sêmen foi diluído em CS e Ag, os espermatozoides sofreram alterações anatômicas e aglutinação, inviabilizando a análise. O FS não gerou alteração anatômica e nem aglutinação dos espermatozoides, sendo possível avaliar a eficiência do corante. Ao analisar a combinação RB X FS verificou-se a melhor média estimada de 9,97 pontos (P<0,05), com baixa sujidade e boa eficiência do corante. A combinação WM X FS resultou na média estimada de 7,35 pontos e a do VC X FS de 6,83 pontos que foram valores menores (P<0,05) em comparação aos esfregaços da combinação RB X FS. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a combinação do RB X FS apresentou os melhores resultados, sendo recomendado preparar esfregaços para analisar a morfologia dos espermatozoides de pacus (*Piaractus mesopotamicus*).

PALAVRAS-CHAVE: Espermatozoides, piscicultura, Rosa Bengala, Vermelho Congo, Williams modificado

DIFFERENT TECHNIQUES TO EVALUATE TO STAIN FISH SEMEN

STREIT-JR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Different techniques to evaluate to stain fish semen. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(2): p. 157-162, 2004.

ABSTRACT: The analyses of spermatozoa morphology from semen obtained from pacus (*Piaractus mesopotamicus*) consisted of three fixers solution: formal-saline buffered (FB), 3 % sodium citrate dihydrated (SC) and distilled water (DW) and to stain the spermatic cells were used three dyeing: Congo red (CR), Bengal rose (BR) and Williams modified (WM). Combinations of dyeing and fixers solution were: BR x BF, WM x FB, CR x FB, CR x DW, WM x DW, WM x SC and CR x SC. In the rubbing brush stained evaluation was considered spermatozoa anatomic alterations, dyeing efficiency, agglutination and dirtiness. For semen diluted in SC and DW was observed spermatozoa anatomic alterations and agglutination on the rubbing brush, becoming impossible any analyses. When semen was diluted in FB to prepare rubbing brush was not observed spermatozoa anatomic alterations and agglutination, becoming possible to evaluate dyeing efficiency. In analyze of BR x FB combination was verified the best estimate average of 9.97 points (P<0.05), showing reduced dirtiness and good efficiency of dyeing. When combination was WM x FB the estimate average was 7.35 points and CR x FB was 6.83 points which were lower (P<0.05) than the average verified in the rubbing brush stained with BR x FB. According to the results observed in this study, the best combination to evaluate spermatozoa morphology from pacus semen was rubbing brush stained with BR x FB combination.

KEY WORDS: Spermatozoon, Fishculture, Bengal rose, Congo red, Williams modified

EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA COLOREAR SÊMEN DE PECES

STREIT-JR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Evaluación de técnicas para colorear sêmen de peces. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(2): p. 157-162, 2004.

* Trabalho aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA – UEM). Parecer 046/2003.

¹Oceanólogo - Doutorando em Zootecnia – Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá-PR. email: danilostreit@hotmail.com

²Médico Veterinário - Dr. Prof. Associado do Departamento de Zootecnia, UEM. gvmoraes@uem.br

⁴Zootecnista – Dr. Prof. Adjunto do Departamento de Zootecnia, UEM.

³Zootecnista – Doutorando em Zootecnia – UEM

⁵Zootecnista – Graduado na UEM

RESUMEN: El análisis de la morfología de los espermatozoides del semen colectado de 30 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) consistió en tres soluciones fijadoras: Formol salina tamponada (FS), citrato sodio bihidratado al 3% (CS) y agua destilada (Ag) y para colorear las células espermáticas tres colorantes: Rojo Congo (VC), Rosa Bengala (RB) y Williams – modificado (WM). Las combinaciones de colorantes y soluciones fijadoras utilizadas fueron: RB x FS, WB x FS, VC x FS, VC x Ag, WM x Ag, WM x CS y VC x CS. En la evaluación de los frotis se tuvo en cuenta las alteraciones anatómicas, la eficiencia del colorante, la aglutinación y la suciedad. Cuando el semen fue diluido en CS y Ag, los espermatozoides sufrieron alteraciones anatómicas y aglutinación, inviabilizando el análisis. El FS no generó alteración anatómica ni aglutinación de los espermatozoides, siendo posible evaluar la eficiencia del colorante. Al analizar la combinación RB x FS se verificó la mejor media estimada de 9,97 puntos ($P < 0,05$) con baja suciedad y buena eficiencia del colorante. La combinación WM x FS resultó en el promedio estimado de 7,35 puntos y la de VC x FS de 6,83 puntos que fueron valores menores ($P < 0,05$) en comparación a los frotis de la combinación RB x FS. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la combinación de RB x FS presentó los mejores resultados, siendo recomendado para preparar frotis para analizar la morfología de los espermatozoides de pacus (*Piaractus mesopotamicus*).

PALABRAS CLAVES: Espermatozoides, piscicultura, Rosa de Bengala, Rojo Congo, Williams modificado

Introdução

Com o crescimento da piscicultura (FAO 2001), inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar a qualidade dos gametas masculinos produzidos (YAO *et al.*, 2000; WILLIOT *et al.*, 2000; TVEDT *et al.*, 2001; TADDEI *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2002).

Diferente do que ocorre em peixes, em sêmen de mamíferos, a avaliação de alterações morfológicas dos espermatozoides é considerada um parâmetro importante para uma boa avaliação do sêmen (VALE FILHO, 1980; BARTH & OKO, 1989; HERMAN *et al.*, 1994; HAFEZ & HAFEZ, 2000). Para que esta análise seja realizada faz-se necessária a preparação de lâminas com espermatozoides fixados e corados.

Em verificação de alterações morfológicas de espermatozoides de mamíferos, inúmeros corantes são utilizados a fim de evidenciar as células espermáticas, como: Williams modificado (VALE FILHO, 1980), coloração de Karras (CBRA, 1998), eosina-nigrosina (CASSINELLO *et al.*, 1998), eosina-anelina azul e corante Giemsa (BARTH & OKO, 1989; CASSINELLO *et al.*, 1998), tinta da China e coloração supravital (HAFEZ & HAFEZ, 2000), Vermelho Congo (AGUIAR *et al.*, 1994; AGUIAR *et al.*, 1996), Rosa Bengala (RODRIGUES & RODRIGUES, 1998; GALVANI *et al.*, 2000), uranil acetato e citrato chumbo (TADDEI *et al.*, 2001), além de muitos outros.

Para que se possa corar lâminas para analisar as alterações morfológicas, faz-se necessária a utilização de soluções diluidoras que fixem os espermatozoides, o que pode determinar a boa qualidade das lâminas preparadas. Soluções como formol-salina (AGUIAR *et al.*, 1994; AGUIAR *et al.*, 1996; GALVANI *et al.*, 2000), formol-citrato (RODRIGUES & RODRIGUES, 1998), citrato de sódio formalada (JOBIM *et al.* 1995; HORN *et al.* 1996), formaldeído (CASSINELLO *et al.*, 1998) e uma outra infinidade de soluções fixadoras.

Para uma boa análise da lâmina a ser observada, são necessários alguns pré-requisitos quanto à coloração, como: formulação correta do corante, utilizado-se material de boa qualidade, tempo de aplicação da técnica adotada e o custo da metodologia empregada (BARTH & OKO, 1989).

Em peixes, as alterações morfológicas de espermatozoides ou mudança anatômica dos espermatozoides são abordadas tão somente em pesquisas. Em alguns estudos onde foram verificadas estas análises, como no sêmen de catfish africano (*Clarias gariepinus*) (MANSOUR *et al.*, 2002), ocean pout (*Macrozoarces americanus*) (YAO, *et al.*,

1999) e *Diplodus puntazzo* (TADDEI *et al.*, 2001) foram utilizadas técnicas elaboradas para observação de mudanças através de microscopia eletrônica. No Brasil, MURGAS *et al.* (1999) e KAWAMOTO *et al.* (1999) utilizaram procedimentos mais simples como o uso da microscopia ótica, visando as análises de morfologia de sêmen de peixes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor combinação entre solução de fixação e metodologia de corar esfregaços, para estudar alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes.

Material e Métodos

A realização do experimento ocorreu durante a temporada de reprodução dos pacus (*Piaractus mesopotamicus*), de novembro de 2001 a agosto de 2002, na Estação de piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM)/CODAPAR, juntamente com o Laboratório de Reprodução Animal da UEM.

Após 240 unidade térmica acumulada (UTA) a uma temperatura de $25,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$, foi obtida uma amostra de sêmen de cada *P. mesopotamicus*, utilizando-se, no total, 30 animais induzidos com extrato de hipófise de carpa (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). O valor de 240 UTA é o estabelecido, na região, para obter-se sêmen dessa espécie durante o período reprodutivo, além de ser o recomendado por CECCARELLI *et al.* (2000) para esta espécie induzida com extrato de hipófise de carpa.

Colhido o sêmen de cada animal, diluiu-se, a seguir, em: água destilada, citrato de sódio diidratada a 3% ou formol-salina tamponada (CBRA, 1998), na proporção de 1:2000 (sêmen/solução, respectivamente). Para confecção das lâminas de cada solução e posterior coloração, adaptou-se o método proposto por BARTH & OKO (1989). Na metodologia original recomendada pelos autores, para o sêmen de mamíferos, deve ser utilizada uma placa aquecedora. Nesse experimento, com peixes, dispensou-se este procedimento, devido às características fisiológicas dessa espécie animal, sendo feito o esfregaço à temperatura ambiente e que foi $+1^\circ\text{C}$ mais elevada em relação a água dos aquários onde os animais estavam alocados.

Para fixar e corar os espermatozoides, utilizou-se sete combinações (Tab. 1). Para os corantes Vermelho Congo e Williams-modificado utilizou-se a metodologia proposta pelo CBRA (1998) e para o Rosa Bengala de acordo com HERMAN *et al.* (1994). Para este corante é necessário que os espermatozoides sejam fixados em solução formol-

salina tamponada. Portanto, esse corante não foi utilizado nas demais soluções fixadoras propostas (água destilada ou citrato de sódio diidratado a 3%).

Tabela 1 - Combinação entre solução de fixação (formol salina tamponada, citrato de sódio diidratado a 3% e água destilada) e corantes (Rosa Bengala, Vermelho Congo e Williams-modificado), utilizados no sêmen de *Piaractus mesopotamicus*

Corantes	Soluções de fixação		
	Formol salina tamponada	Citrato de sódio diidratado a 3%	Água destilada
Rosa Bengala	X	-	-
Vermelho Congo	X	X	X
Williams modificado	X	X	X

Para possibilitar a análise estatística foram atribuídos escores com notas pré-estabelecidas de acordo com os critérios relacionados como importantes por BARTH & OKO (1989) para avaliar uma lâmina com espermatozoides fixados. Para cada lâmina de cada tratamento analisada em microscópio de contraste de fase em aumento de 40x, somou-se os escores atribuídos para cada variáveis resposta de acordo com a fórmula: $\Sigma = \text{Alteração anatômica dos espermatozoides} + \text{Aglutinação} + \text{Eficiência do corante} + \text{Sujidade}$. Os escores seguiram a seguinte pontuação:

Alteração anatômica dos espermatozoides e aglutinação:	não -	3 pontos
	sim -	0 ponto
Eficiência do corante:	bom -	3 pontos
	regular	1,5 pontos
	ruim	0 ponto
Sujidade	baixa	1 ponto
	suja	0 ponto

Para análise estatística utilizou-se a metodologia de modelos lineares generalizado, implementado pelo PROC GENMOD (SAS, 1992), considerando os erros como de distribuição de Poisson. O modelo proposto para análise foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \hat{\alpha}_{ij}$$

Y_{ij} = observação da lâmina (j) que recebeu o tratamento (i);

μ = constante geral;

T_i = efeito do tratamento (i);

$\hat{\alpha}_{ij}$ = erro aleatório associado a observação (j) que recebeu o tratamento (i)

Para obtenção das fotos apresentadas no trabalho utilizou-se um microscópio Zeiss invertido, modelo Axiovert 135, com aumento de 1000 vezes.

Resultados e Discussão

Na tabela 2 estão relacionadas as médias estimadas dos escores para cada tratamento. Em lâminas preparadas

com citrato de sódio diidratado a 3% ocorreu uma alteração anatômica e aglutinação dos espermatozoides, tornando-o inapropriado para avaliação de alterações morfológicas destas células (Fig. 1a e 2a). Essa constatação é reforçada pelas observações das médias estimadas dos escores de 2,1 e 0,87 pontos para (VC) X (CS) e (WM) X (CS), respectivamente, sendo baixos ($P < 0,05$) em relação aos tratamentos com formol salina tamponada, em que as médias foram de 9,97; 7,35 e 6,83 para os combinações (RB X FS), (WM X FS) e (VC X FS), respectivamente (Tab. 2). A alteração anatômica observada, quando foi utilizado a solução de citrato de sódio diidratado a 3% pode estar relacionada com a diferença de osmolaridade entre a solução utilizada e a estrutura da membrana plasmática do espermatozoide (HERMANN *et al.*, 1994). Todavia, a solução fixadora de citrato de sódio diidratado a 3% é utilizada, com sucesso, na análise de morfologia espermática de mamíferos (JOBIM *et al.*, 1995; HORN *et al.*, 1996). Possivelmente, os espermatozoides de peixes apresentaram menor resistência à variação osmótica em relação aos de mamíferos (COSSON *et al.*, 1999).

Tabela 2 - Estimativas do parâmetro do modelo, erro padrão e as médias estimadas dos escores dos tratamentos Rosa Bengala X formol salina tamponada (RB X FS), Vermelho Congo X formol salina tamponada (VC X FS), Williams modificado X formol salina tamponada (WM X FS), Vermelho Congo X água destilada (VC X Ag), Williams modificado X água (WM X Ag), Vermelho Congo X citrato de sódio diidratado a 3% (VC X CS) e Williams modificado X citrato de sódio diidratado a 3% (WM X CS)

TRATAMENTOS	ESTIMATIVAS DO PARÂMETRO DO MODELO	MÉDIAS ESTIMADAS
RB X FS	1,56±0,13	9,97a
WM X FS	1,25±0,13	7,35b
VC X FS	1,18±0,14	6,83c
VC X Ag	0,12±0,17	2,37d
WM X Ag	0,05±0,18	2,20d
WM X CS	0,00±0,00	2,10d
VC X CS	-0,90±0,73	0,87e

Quanto a aglutinação dos espermatozoides causada pelo citrato de sódio diidratado a 3%, poderia estar relacionada liberação de alguma enzima, devido a destruição da cabeça do espermatozoide. Entretanto, é uma suposição levantada que poderia ser mais profundamente estuda.

Nos esfregaços preparados com água destilada ocorreu um inchaço e aglutinação dos espermatozoides (Fig. 1b e 2b). Os tratamentos em que usou-se a água como agente fixador, também obtiveram-se médias estimadas de 2,37 e 2,20 pontos nos tratamentos de WM X Ag e VC X Ag, respectivamente, em relação aos tratamentos com formol salina tamponada (Tab. 2). A água destilada foi utilizada como meio fixador por ser o meio em que os peixes ovulparos liberam seus gametas (VAZZOLER, 1996) e, portanto, meio em que os espermatozoides são ativados naturalmente (GINZBURG, 1972). A aglutinação dos espermatozoides, utilizando-se esse fixador, pode estar correlacionada às propriedades físico-química da água e do vidro das lâminas que serviram

de suporte para os esfregaços. A tensão superficial da água, associada a sua estrutura polar, pode ter levado ao quadro de aglutinação, uma vez que a água, por possuir cargas positivas e negativas, adere com força a qualquer outra superfície carregada de íons (positivo e negativo) (ARANA, 1997). A hidratação repulsiva e as forças de atração hidrofóbicas são duas forças de superfícies observadas em filmes aquosos delgados (HANSEN, 1997) o que, portanto pode-se imaginar ter ocorrido com o sêmen fixado em água destilada.

Problemas como alteração anatômica e aglutinação dos espermatozoides não foram verificados nos esfregaços; a solução diluidora foi a formol-salina tamponada, que, foi considerada o melhor agente no preparo de esfregaços para estudos de morfologia espermática de pacu (Fig. 1c; 2c e 3). Porém, as médias estimadas dos escores foram diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos em que a solução formol salina tamponada foi o fixador, devido à sujidade e a eficiência de cada corante (Tab. 2). A solução fixadora formol-salina tamponada ou meio de Hancock é usada, com frequência, por pesquisadores que estudam morfologia de espermatozoides de outras espécies animais, como AGUIAR *et al.* (1996) que utilizaram, com sucesso, o formol-salina tamponada para diluição e preparação de esfregaços com sêmen de bubalinos e por GALVANI *et al.* (2000) ao avaliarem espermatozoides de touros Nelore.

A avaliação da morfologia dos espermatozoides em que se aplicou o corante Vermelho Congo, depois de fixado em formol salina tamponada, não foi eficiente, pois a média estimada do escore foi a mais baixa ($P < 0,05$) para aqueles tratamentos em que a solução formol salino tamponada serviu de agente fixador. Na figura 1c pode-se observar que o corante Vermelho Congo tornaram as células espermáticas muito escura, impossibilitando uma análise criteriosa. Esta situação é diferente quando se utiliza este corante para sêmen de cães, como ficou constatado por AGUIAR *et al.* (1994) que obtiveram boa resposta com o uso desse corante em esfregaços preparados com formol salina tamponada.

O método de Williams-modificado, usando formol salina tamponada como agente fixador, corou os espermatozoides com melhor qualidade do que o Vermelho Congo, mas foi inferior ao Rosa Bengala (Fig. 2c). Porém, apesar de ter corado os espermatozoides relativamente bem, tem a desvantagem de ser mais demorado do que o Rosa Bengala. Durante as análises das lâminas verificou-se maior quantidade de sujeira nos tratamentos em que o corante Williams modificado foi o corante. A sujidade encontrada nos esfregaços corados com William modificado pode estar relacionada com a pouca eficiência da policrilamima-T, composto presente na metodologia e que se destina a limpar as lâminas durante a coloração. A boa qualidade do material corado e o tempo para corar as células espermáticas são pré-requisitos importantes para escolha da metodologia aplicada (BARTH & OKO, 1989).

Assim, como inúmeros procedimentos usados para corar lâminas, o método de Williams-modificado é utilizado para outras espécies animais, como HORN *et al.* (1996) que verificaram morfologia espermática em sêmen de bovino. Nestes trabalhos, os autores usaram solução isotônica de citrato de sódio formolada como fixador do sêmen para preparar esfregaços. É provável que a solução fixadora do sêmen possa melhorar a ação de um determinado corante, mas a solução proposta por HORN *et al.* (1996) não é recomendada para fixar sêmen de peixes por conter citrato, substância que causa injúrias aos espermatozoides de pacu, conforme demonstrado neste trabalho.

Os espermatozoides corados pelo método de Rosa Bengala, mostraram melhor definição da cor, quando comparado com o Vermelho Congo e Williams-modificado (Fig. 3). Esse fato pode ser comprovado quando observou-se as maiores médias estimadas dos escores ($P < 0,05$) no tratamento (RB X FS) em relação aos outros dois tratamentos em que usou-se a formol salina tamponada como fixador (Tab. 2). Os esfregaços corado pelo Rosa Bengala reuniram melhores qualidades na avaliação da morfologia

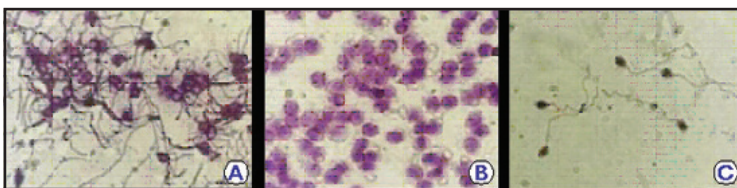


Figura 1 - Espermatozoides de *Piactus mesopotamicus*, corados pelo método Vermelho Congo, fixados em citrato de sódio diidratado a 3% (a); água destilada (b) e formol-salina tamponada (c)

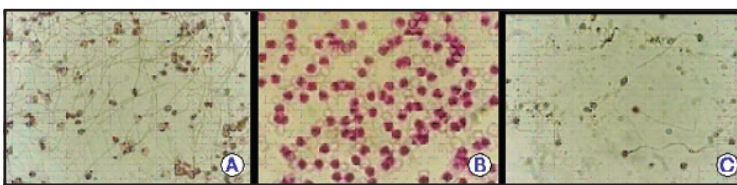


Figura 2 - Espermatozoides de *Piactus mesopotamicus*, corados pelo método Williams-modificado, fixados em citrato de sódio diidratado a 3% (a); água destilada (b) e formol-salina tamponada (c)

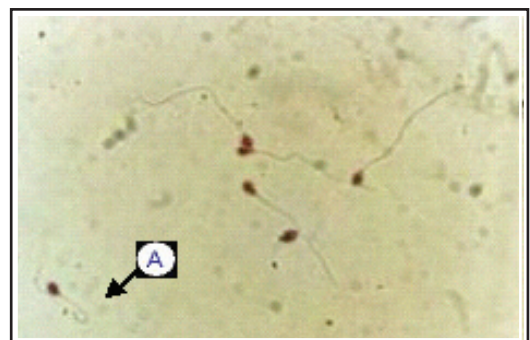


Figura 3 - Espermatozoides de *Piactus mesopotamicus*, corados pelo método Rosa Bengala. Note-se a presença de espermatozoide com alteração anatômica (A)

de espermatozoides de peixes, como a reduzida sujidade e a boa definição da cabeça dos espermatozoides. Não houve alteração anatômica e aglutinação dos espermatozoides devido a utilização da solução de fixação formol-salina tamponada e, a ação do corante foi eficiente na coloração sem agregar sujeiras nas lâminas em decorrência da metodologia empregada. O corante Rosa Bengala foi usado por RODRIGUES & RODRIGUES (1998) para analisar a viabilidade do sêmen de cão, observando boa qualidade das lâminas confeccionadas, resultado igualmente encontrado por GALVANI *et al.* (2000) em esfregaços de sêmen de touro Nelore.

Neste estudo, as lâminas coradas pelo método Rosa Bengala enquadraram-se nos requisitos abordados por BARTH & OKO (1989) em bovinos. Esse método mostrou ser efetivo nas avaliações de esfregaços de sêmen de pacu, quando comparado com Vermelho Congo e ao Williams-modificado, pois agregou menos sujidade, além de ter corado com mais eficiência.

Conclusão

O corante Rosa Bengala é um método eficiente de coloração de esfregaços de sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) diluído em formol salina tamponada.

Referências

- AGUIAR, P.H.P., ABREU, J.J., COSTA, M.E.L.T. *et al.* Coleta e avaliação de sêmen canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.46, n.5, p.537-544, out. 1994.
- AGUIAR, P.H.P., ANDRADE, V.J., ABREU, J.J. *et al.* Aspectos físicos e morfológicos e pH do sêmen de reprodutores bubalinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.48, n.3, p.325-331, jun. 1996.
- ARANA, L.V. *Princípios químicos da qualidade da água em aquíicultura*. Florianópolis: DAUFSC, 1997. 166p.
- BARTH, A.D., OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989, 285p.
- CASSINELLO, J., ABAIGAR, T., GOMENDIO, M. *et al.* Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorh*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.113, n.1, p.35-45, may. 1998.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*, 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G.P. *Dicas em piscicultura; perguntas e respostas*. Santina Gráfica Editora: Botucatu. 2000, 247p.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C. *et al.* Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: C. GAGNON (Ed.). *In the male gamete: From basic knowledge to clinical applications*. Paris: Cache River Press, 1999. p. 161-186.
- FAO - FUNDO DA ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. *Estatísticas*. 2001 Disponível em <<http://www.fao.org/pesca/estatistica>>. Acesso em: 10 jul. 2001.
- GALVANI, F., COSTA, E.P., TORRES, C.A.A. *et al.* Perímetro escrotal, características físicas do sêmen e morfopológicas dos espermatozoides de touros Nelore de alta libido comparados com animais de libidos inferiores. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, v.16, n.2, p.97-103, ago. 2000.
- GINZBURG, A.S. The spermatozoon. In: DETLAF, T.A. (ed.) *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Jerusalém: Keter Press, 1972. p.87-155.
- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (ed). *Reproduction in farm animals*. 7. ed. Philadelphia: Lippicott Williams and Wickins, 2000. 509p.
- HANSEN, C.M. Cohesion energy parameters applied to surface phenomena. In: BIRDI, K.S. (ed.). *Surface and colloid chemistry*. Boca Raton: CRC Press, 1997. p.313-332.
- HERMAN, H.A., MITCHELL, J.R., DOAK, G.A. Evaluation of semen – morphology. In: HERMAN, H.A., MITCHELL, J.R., DOAK, G.A. (eds.). *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. 8. ed. Dauville: Interstate Publishers, Inc., 1994. p.85-92.
- HORN, M.M., SCUMACHER, J.G., LOPES, R.F.F. *et al.* Eficiência de três diluidores na congelação de sêmen bovino. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v.24, n.2, p.46-56, jul./dez. 1996.
- JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., WALD, V.B. Características de sêmen bovino importado-II. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v.23, p.63-76, único, 1995.
- 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 (único), p.61-66, 1999.
- MANSOUR, N., LAHNSTEINER, F., PATZNER, R.A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behavior in seminal vesicle secretion. *Journal of Fish Biology*, Londres, v.60, n.2, p. 545-560, feb. 2002.
- MURGAS, L.D.S.; SILVA, MO.B.; MELLO, C.B.M. *et al.* Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.23, n.3, p.246-248, 1999.
- RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) ao diluidor à base de tris sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v.26, n.2, p.32-49, jul./dez. 1998.
- SAS Institute Inc. *SAS technical report*. Release 6.07 Cary: NC, 1992, 229p.
- 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*, San Diego, v.42, n.4, p.244-255, jun. 2001.
- TANAKA, S., ZHANG, H., YAMADA, Y. *et al.* Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. *Journal of Fish Biology*, Londres, v. 60, n.4, p.1134-1141, apr. 2002.
- TVEDT, H.B., BENFEY, T.J., MARTIN-ROBICHAUD, D.J. *et al.* The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 194, n.1/2, p.191-200, mar. 2001.
- VALE FILHO, V.R. *Patologia do sêmen*. 2.ed. Belo Horizonte:

Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 1980, 54p.

VAZZOLER, A.E.A.M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos teoria e prática*. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1996. 169p.

YAO, Z., RICHARDSON, G.F., CRIM, L.W. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*, Amesterdan, v.174, n.1/2, p.183-193, apr. 1999.

YAO, Z., CRIM, L.W., RICHARDSON, G.F. *et al*. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, Amsterdan, v.181, n.3/4, p. 361-375, jan. 2000.

WILLIOT, P., KOPEIKA, E.F., GONCHAROV, B.F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon. *Aquaculture*, Amesterdan, v.189, n.1/2, p.53-61, sep. 2000.

WOYNAROVICH, E., HORVÁTH, L. *A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão*. Brasília: Escopo. 1983. 220p.

Recebido para publicação em 05/05/2004.

Received for publication on 05 May 2004.

Recibido para publicación en 05/05/2004.

Aceito para publicação em 02/07/2004.

Accepted for publication on 02 July 2004.

Accepto para publicación en 02/07/2004.