

PARÂMETROS QUALITATIVOS DO SÊMEN E MORFOLOGIA COMPARADA DA CABEÇA E PEÇA INTERMEDIÁRIA DO ESPERMATOZOIDE DE PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*), PACU (*Piaractus mesopotamicus*) E TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)¹

E. G. Gregorin², V. O. Felizardo², C. C. V. Melo^{3*}, R. T. F. Freitas², U. N. Souza⁴, A. C. Costa⁵

¹Recebido em 26/06/2018. Aprovado em 10/04/2019.

²Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil;

³Centro Universitário Tocantinense Presidente Antônio Carlos, Araguaína, TO, Brasil;

⁴Instituto Federal do Mato Grosso, São Vicente da Serra, MT, Brasil;

⁵Instituto Federal Goiãno, Rio Verde, GO, Brasil.

*Autor correspondente: carloscicinato85@gmail.com

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros qualitativos do sêmen e comparar a morfologia da cabeça do espermatozoide entre três espécies de peixes, *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus* e *Colossoma macropomum*. As amostras de sêmen foram coletadas de nove animais, três machos de cada espécie, por método de reprodução induzida no mês de novembro de 2011. Os espermatozoides foram submetidos à análise de motilidade e estudo da morfologia em microscopia eletrônica de varredura. As taxas de motilidade das três espécies avaliadas foram acima de 90%, não diferindo entre elas. Porém, a duração de motilidade do sêmen de pacu foi superior as demais espécies. O comprimento da cabeça (CC) dos espermatozoides de pacu, Pirapitinga e Tambaqui foram, respectivamente, $2,43 \pm 0,19 \mu\text{m}$, $1,94 \pm 0,07 \mu\text{m}$ e $2,44 \pm 0,12 \mu\text{m}$. A largura da cabeça (LC) foram, respectivamente, $1,45 \pm 0,07 \mu\text{m}$, $1,76 \pm 0,07 \mu\text{m}$ e $1,56 \pm 0,06 \mu\text{m}$. O comprimento da peça intermediária foram, respectivamente, $1,00 \pm 0,10 \mu\text{m}$, $1,54 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $2,07 \pm 0,33 \mu\text{m}$. Os resultados revelam que os espermatozoides das três espécies diferem entre si na morfologia externa quanto ao tamanho e formato da cabeça, e nas proporções de comprimento da peça intermediária.

Palavras-chave: Estrutura morfológica, microscopia eletrônica, motilidade espermática, peixe.

QUALITATIVE SEMEN PARAMETERS AND COMPARATIVE MORPHOLOGY OF PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*), PACU (*Piaractus mesopotamicus*) AND TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SPERM

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate qualitative semen parameters and to compare the morphology of the sperm head among three fish species, *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus* and *Colossoma macropomum*. The semen samples were collected from nine animals, three males per species, by the induced reproduction method in November 2011. Sperm motility was evaluated and morphology was analyzed by scanning electron microscopy. The motility rates of the three species evaluated were higher than 90%, with no difference between species. However, the duration of sperm motility was longer for pacu semen compared to the other species. The head length was 2.43 ± 0.19 , 1.94 ± 0.07 and $2.44 \pm 0.12 \mu\text{m}$ for pacu, pirapitinga and tambaqui sperm, respectively. The head width was 1.45 ± 0.07 , 1.76 ± 0.07 and $1.56 \pm 0.06 \mu\text{m}$, and the length of the intermediate piece was 1.0 ± 0.10 , 1.54 ± 0.08 and $2.07 \pm 0.33 \mu\text{m}$, respectively. The results show that the sperm of the three species differs in terms of external morphology (size and shape of the head) and in relation to the length of the intermediate piece.

Keywords: Morphological structure, electron microscopy, sperm motility, fish.

INTRODUÇÃO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887), a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (Cuvier, 1818) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818) pertencem à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Serrasalminae, todos, peixes reofílicos nativos brasileiros (ESCHMEYER e FONG, 2009). Os chamados peixes redondos (pacu, patinga, tambacu e tambatinga) representaram 10,4% (50.719.657 kg) da produção de peixes no Brasil (IBGE, 2015).

O pacu é originário das bacias dos Rios Paraguai e Prata, a pirapitinga das Bacias do rio Amazonas e Orinoco, e o tambaqui da bacia do rio Amazonas. Esta última é a espécie nativa mais criada no Brasil (IBGE, 2018), por apresentar excelentes características zootécnicas para produção (MARCOS et al., 2016; SOUSA et al., 2018).

A popularização da produção de espécies peixes redondos, que incluem o tambaqui, o pacu, a pirapitinga, tem crescido expressivamente no Brasil (IBGE, 2018). O pacu apresenta boa tolerância a temperaturas mais baixas, já a pirapitinga e o tambaqui apresenta risco de mortalidade elevada durante os meses de inverno, o que tem desencorajado o cultivo destes peixes nos estados das regiões Sul e Sudeste, particularmente em locais onde a água pode atingir temperaturas abaixo dos 17 °C.

Assim, a produção de híbridos, a partir do cruzamento de pacu, pirapitinga e tambaqui, têm sido uma boa estratégia para produzir peixes com características favoráveis de ganho de peso, resistência ao frio, rusticidade e adaptação à alimentação artificial (ALVES et al., 2014).

Apesar da constatação de que a produção de híbridos interespecíficos ser uma prática comum na piscicultura brasileira, estudos comparativos dos gametas, de desenvolvimento gonadal e características de desenvolvimento embrionário advindas da produção de híbridos envolvendo cruzamento entre as espécies pacu, tambaqui e pirapitinga ainda não foram devidamente estudadas. A busca por conhecimento nos estudos de reprodução de peixes ocorre paralelamente a questões econômicas e ecológicas e, neste sentido, a morfologia dos espermatozoides

é de suma importância na avaliação de seus parâmetros reprodutivos (STREIT et al., 2009).

Tanto na reprodução natural como na artificial a qualidade do sêmen é de crucial importância, refletindo no sucesso da fertilização e cuja eficiência está diretamente relacionada à qualidade dos gametas, que por sua vez são influenciados por fatores ambientais e hormonais (MURGAS et al., 2015). Para uma compreensão mais holística dos fatores ambientais relacionados à reprodução, há necessidade do conhecimento da biologia reprodutiva das espécies envolvidas, o que engloba também o conhecimento da estrutura de seus gametas.

A microscopia eletrônica atualmente está se mostrando uma ferramenta mais eficaz para avaliação das estruturas morfológicas dos espermatozoides, pois fornece informações mais detalhadas, gerando uma confiabilidade maior dos resultados, tanto para morfologia externa quanto para ultraestruturas.

Assim, a descrição da estrutura morfológica dos espermatozoides de peixes é relevante porque diferenças na morfologia do espermatozoide refletem diferenças na capacidade funcional e na filogenia dos grupos (PSENICKA et al., 2007). Como resultado, uma elevada diversidade intra e interespecífica tem sido relatada (PSENICKA et al., 2007), subentendendo-se assim, que estudos mais detalhados da morfologia descritiva dos gametas se faz necessário.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros qualitativos do sêmen das três espécies em questão, além de descrever e comparar a morfologia da cabeça do espermatozoide do pacu, tambaqui e pirapitinga por meio da microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no mês de novembro de 2011, em piscicultura particular (LUFADA) localizado em Cuiabá-MT, Brasil. (Autorização Protocolo nº 074/13).

Foram utilizados nove reprodutores, três machos de pacu, de pirapitinga e de tambaqui que apresentavam liberação de sêmen sob leve compressão abdominal. Os animais foram induzidos à reprodução com 1,5mg de EBHC (extrato bruto de hipófise de carpa) /Kg de peixe, em dose

única, aplicada intramuscularmente. Após 8 horas, foi realizada a coleta do sêmen mediante massagem abdominal, no sentido craniocaudal em cada reprodutor, colhendo-se o sêmen liberado em seringas de 10 ml do orifício urogenital que foi previamente seco com papel toalha para evitar a contaminação.

Os parâmetros propostos no experimento foram: avaliação espermática do sêmen *in natura* e amostras de sêmen coletadas e fixadas em solução Karnovsky para mensuração em MEV (microscópio eletrônico de varredura). Para a motilidade espermática, uma fração de 0,01 ml da solução sêmen: água (1:14) foi avaliada subjetivamente em microscópio óptico (objetiva 40x). Os valores atribuídos são de 0 a 100% para a motilidade em função da movimentação dos espermatozoides e marcando o tempo de duração da motilidade em minutos e segundos (STREIT, 2009).

Para o estudo morfológico, após a extrusão, o sêmen de cada reprodutor foi coletado em Eppendorfs e fixado em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2; cloreto de cálcio 0,001M), para serem avaliados no MEV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e

Análise Ultra Estruturais da UFLA.

As amostras fixadas permaneceram por 24 horas, a 4°C, sendo pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio 1%, por 4 horas, à temperatura ambiente. As amostras foram subsequentemente desidratadas por meio de uma série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) e depois desidratadas por meio do aparelho de ponto crítico CPD 030, cobertas com ouro sob vácuo em evaporador SCD 050, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP ESC (Psenicka, 2007). Foram selecionadas imagens de 50 espermatozoides de cada uma das espécies (pacu, pirapitinga e tambaqui), totalizando uma amostra de 150 células.

As variáveis obtidas de cada espermatozoide foram 1) comprimento da cabeça (CC), 2) largura da cabeça (LC) e comprimento da peça intermediária (PI). A figura 1 mostra os limites de cada variável morfométrica. As medidas dos 150 espermatozoides foram realizadas usando o programa Zeiss AxioVision Rel. 4.8.

As variáveis (CC; LC e PI) dos espermatozoides de cada espécie foram calculados para os parâmetros seminais dos machos. As três variáveis foram comparadas pelo teste univariado *t* de Student a 5%,

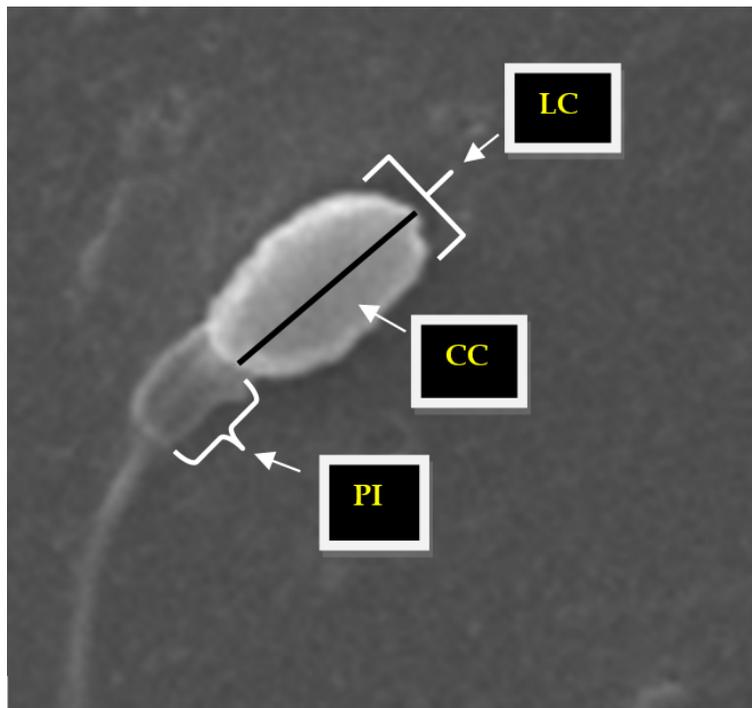


Figura 1 - Medidas da cabeça do espermatozoide de pacu: Comprimento da cabeça (CC), 2) largura da cabeça (LC) e comprimento da peça intermediária (PI).

comparando as variáveis por par de espécies. Para as variáveis taxa e duração da motilidade foram comparados pelo teste de Tukey a 5 %. Os dados foram analisados pelo programa Statistica 7®.

RESULTADOS

Não foi verificada diferença significativa na taxa de motilidades entre as espécies estudadas (Tabela 1). No entanto, a duração da motilidade do sêmen de pacu (90,00±1,00) foi superior ao da pirapitinga (61,00±3,00) e tambaqui (75,33±1,55), sendo que a pirapitinga apresentou o menor tempo de duração da motilidade espermática (Tabela 1).

A tabela 2 discrimina os dados descritivos em relação aos parâmetros morfológicos (as variáveis CC, LC e PI) para as espécies estudadas. O exame da tabela 2 e figura 2 mostra que a cabeça e peça intermediária dos espermatozoides das três espécies em

questão apresentam diferenças notórias de formato e tamanho. O espermatozoide de *P. mesopotamicus* possui uma cabeça mais longa e menor comprimento da peça intermediária em relação a *P. brachypomus* e *C. macropomum*. Por outro lado, *C. macropomum* possui uma relação entre o comprimento e largura da cabeça próxima a um, ou seja, apresenta um aspecto mais arredondado; por outro lado, a peça intermediária é proporcionalmente a maior nesta espécie, sendo ela mais longa que a cabeça do espermatozoide (Tabela 2).

Uma comparação entre as três variáveis dos espermatozoides por meio do teste *t*, *P. mesopotamicus* X *P. brachypomus* (Tabela 3), *P. brachypomus* X *C. macropomum* (Tabela 3) e *P. mesopotamicus* X *C. macropomum* (Tabela 3), confirmam os resultados observados na estatística descritiva para as dimensões absolutas das três variáveis (tabelas 3), todas com níveis de significância elevados, bem abaixo de 5%.

Tabela 1 - Média e Desvio padrão dos parâmetros seminais dos machos de *P. mesopotamicus*, *P. brachypomus* e *C. macropomum* para motilidade e duração da motilidade e volume seminal.

Espécie	N	Motilidade subjetiva (%)	Tempo duração motilidade (s) ¹
<i>P. mesopotamicus</i>	3	91,66±7,63 ^a	90,00±1,00 ^a
<i>P. brachypomus</i>	3	93,33±7,63 ^a	61,00±3,00 ^c
<i>C. macropomum</i>	3	100±0,00 ^a	75,33±1,55 ^b

¹Tempo em minutos;

Médias seguidas por letras sobscritas minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Estatística descritiva das três médias dos espermatozoides das três espécies (*P. mesopotamicus*, *P. brachypomus*, *C. macropomum*).

Espécie	N	Variável	Média (µm) ± Desvio Padrão
<i>P. mesopotamicus</i>	50	CC ¹	2,43±0,19
<i>P. mesopotamicus</i>	50	LC ²	1,45±0,07
<i>P. mesopotamicus</i>	50	PI ³	1,00±0,10
<i>P. brachypomus</i>	50	CC ¹	2,44±0,12
<i>P. brachypomus</i>	50	LC ²	1,56±0,06
<i>P. brachypomus</i>	50	PI ³	1,54±0,08
<i>C. macropomum</i>	50	CC ¹	1,94±0,07
<i>C. macropomum</i>	50	LC ²	1,76±0,07
<i>C. macropomum</i>	50	PI ³	2,07±0,33

¹CC- comprimento de cabeça;

²LC- largura cabeça;

³PI- comprimento peça intermediária.

Tabela 3 - Teste t comparando as três variáveis da cabeça do espermatozoide entre *P. mesopotamicus*, *P. brachypomus* e *C. macropomum*.

N	Variável	Média (µm)	Média (µm)	Probabilidade
		<i>P. mesopotamicus</i>	<i>P. brachypomus</i>	
50	CC ¹	2,43	2,44	0,00
50	LC ²	1,45	1,56	0,00
50	PI ³	1,00	1,54	0,00
		<i>P. brachypomus</i>	<i>C. macropomum</i>	
50	CC ¹	2,44	1,94	0,00
50	LC ²	1,56	1,76	0,00
50	PI ³	1,54	2,07	0,00
		<i>P. mesopotamicus</i>	<i>C. macropomum</i>	
50	CC ¹	2,43	1,94	0,00
50	LP ²	1,45	1,76	0,00
50	PI ³	1,00	2,07	0,00

¹CC- comprimento de cabeça;

²LC- largura cabeça;

³PI- comprimento peça intermediária.

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram, após a ativação dos espermatozoides, uma porcentagem alta da motilidade deles nas três espécies estudadas. Segundo Verma (2009), a motilidade do espermatozoide e seu tempo de duração são parâmetros importantes para avaliação de sêmen de boa qualidade. Cosson (2008) citou que em muitas espécies de peixes a motilidade varia de poucos segundos até minutos dependendo da espécie e do indivíduo e a observação por microscópio óptico é ainda a forma mais usual de analisá-la. Em muitas espécies de peixes, a motilidade espermática dura por períodos curtos de tempo, de 30

segundos até alguns minutos (COSSON, 2008).

Estudos prévios elaborados com as mesmas três espécies estudadas aqui (SANCHES et al., 2011; MARIA et al., 2010 e PESSOA et al., 2009) mostram resultados distintos dos alcançados aqui. Com o sêmen *in natura*, Maria et al. (2010) obteve uma média de 94,5% de motilidade espermática em *C. macropomum*. Pessoa et al. (2009) obteve 95% de motilidade espermática em *P. brachypomus*, e Streit (2009) obteve 69% motilidade espermática em *P. mesopotamicus*. Nota-se que a motilidade espermática obtida aqui para *P. mesopotamicus* foi bem mais elevada (91%) quando comparada ao resultado de Streit (2009). Em *P. brachypomus* a motilidade foi 93%, apenas 2% abaixo do encontrado na

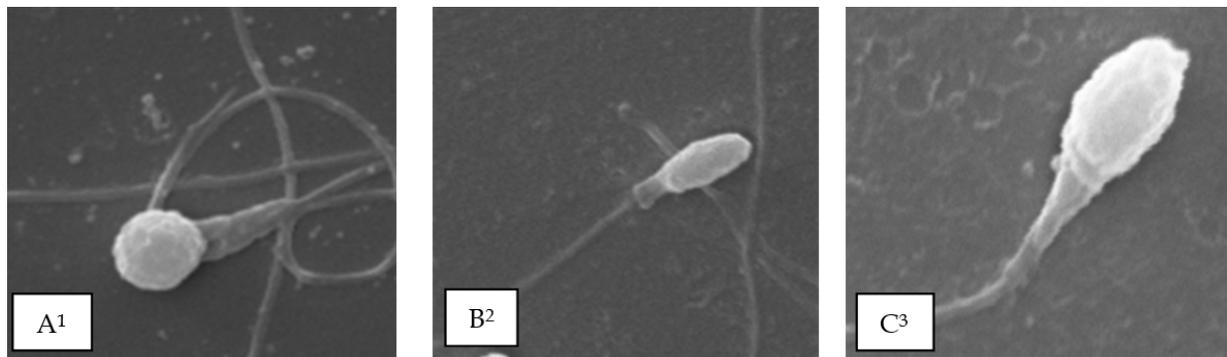


Figura 2 - Imagens da cabeça do espermatozoide das três espécies.

¹A- Tambaqui (*C. macropomum*);

²B- Pacu (*P. mesopotamicus*);

³C- pirapitinga (*P. brachypomus*).

literatura, em e *C. macropomum* a motilidade foi 100%, maior que encontrado na literatura.

De acordo com Viveiros et al. (2009), os espermatozoides da maioria dos peixes teleosteos mostram imobilidade nas gônadas e sua motilidade ocorre no momento em que há contato com a água, e a diferença de osmolaridade entre o sêmen e a ativação solução é responsável por esta ativação (MURGAS et al., 2015).

A diferença entre os diferentes autores na taxa de motilidade, provavelmente é devido as diferentes condições de manejo e protocolos empregados na reprodução de cada pesquisa, de acordo com Felizardo et al. (2016) a qualidade seminal pode ser influenciada por várias razões, como tamanho individual, idade reprodutiva, a ação de coleta sucessiva de sêmen, estação do ano, indução hormonal e a variedade iônica do plasma seminal. Além disso, Murgas et al. (2015) ainda citam outros fatores como a temperatura, estado nutricional, estado de saúde, condições empregadas na ativação de sêmen, como o ativador utilizado e a espécie estudadas.

Dos estudos prévios citados acima, apenas Sanches et al. (2011) avaliou a duração da motilidade. O autor obteve duração da motilidade em *P. mesopotamicus* de $26,34 \pm 0,81$ s. No presente trabalho observou-se resultado superior ($90,00 \pm 1,00$ s). A importância da avaliação da duração da motilidade dos espermatozoides em peixes é porque ele diz respeito ao tempo que o espermatozoide tem disponível para penetrar na micrópila do ovócito e concluir a fertilização (FELIZARDO et al., 2016). De acordo com Andrade e Yasui (2003) nos teleosteos, o tempo de abertura da micrópila é de aproximadamente 60 segundos, o que provavelmente está relacionado com tempo de atividade no espermatozoide.

Embora não exista um valor mínimo para os parâmetros de taxa e duração da motilidade dos espermatozoides em peixes capazes de garantir a eficácia do sêmen, os valores obtidos na maioria estudos são utilizados como parâmetro e considerados como uma garantia da qualidade do sêmen. Segundo Murgas et al. (2011), a redução na duração da motilidade dos espermatozoides em parte ocorre por uma queda na oferta de energia, que ocorre durante o período de mobilidade.

Em relação à morfologia, informações

acerca da ultra-estrutura dos espermatozoides se mostrou necessária para o entendimento de seu funcionamento e eficácia no processo de fecundação. Isto tem relevância para estabelecer relações filogenéticas entre as espécies e importantes no entendimento do processo de fertilização e futuros estudos de hibridação para fins comerciais.

No presente trabalho, avaliou-se o tamanho da cabeça e peça intermediária das espécies em questão onde *P. mesopotamicus* apresentou a cabeça mais ovalada com o comprimento da cabeça com média de $2,43 \mu\text{m}$, largura de $1,45 \mu\text{m}$ e peça intermediária mais curta em relação às outras duas variáveis, medindo $1,00 \mu\text{m}$. *P. brachypomus* também tem cabeça ovalada como o comprimento total de $2,44 \mu\text{m}$, e com a largura da cabeça ($1,56 \mu\text{m}$) e comprimento da peça intermediária ($1,54 \mu\text{m}$) com valores maiores que em *P. mesopotamicus*. Estes resultados são pioneiros uma vez que tais valores não estão disponíveis na literatura. *C. macropomum* apresentou um formato de cabeça arredondado, a média do comprimento foi $1,94 \mu\text{m}$ e da largura bem próximo, de $1,76 \mu\text{m}$; O comprimento da peça intermediária se mostrou maior que as outras duas espécies com média $2,07 \mu\text{m}$, formando um conjunto fenotípico distinto. Em estudo prévio sobre a forma e tamanho da cabeça e comprimento da peça intermediária do espermatozoide de *C. macropomum* foi elaborado por Maria et al. (2010).

Maria et al. (2010) analisou 50 espermatozoides de cada um dos seis machos estudados e obteve estimativas de média do comprimento da cabeça de ($2,77 \mu\text{m}$; $2,79 \mu\text{m}$; $2,69 \mu\text{m}$; $2,73 \mu\text{m}$; $2,68 \mu\text{m}$; $2,73 \mu\text{m}$), média da largura da cabeça de ($2,66 \mu\text{m}$; $2,62 \mu\text{m}$; $2,51 \mu\text{m}$; $2,58 \mu\text{m}$; $2,54 \mu\text{m}$; $2,58 \mu\text{m}$) e média do comprimento da peça intermediária de ($2,96 \mu\text{m}$; $2,49 \mu\text{m}$; $2,64 \mu\text{m}$; $3,20 \mu\text{m}$; $3,23 \mu\text{m}$; $2,90 \mu\text{m}$). Tais resultados também sugerem uma cabeça arredondada, porém de tamanho bem maior do que o apresentado nesse estudo.

Estes resultados divergentes podem ser devido aos protocolos diferentes utilizados, Maria et al. (2010) utilizou como fixador, uma solução de formol citrato, coradas com Rosa Bengala e fotografadas em microscópio com aumento de (1.000 vezes) e no presente experimento foi usada uma solução de Karnovsky como fixador e os espermatozoides

foram fotografados por microscopia eletrônica de varredura. Esses procedimentos podem ter acarretado essa diferença de tamanho. Contudo, outra possibilidade seria que as linhagens da mesma espécie podem ser diferentes, detectando uma variação geográfica ou mesmo uma divergência taxonômica e é de fundamental interesse para estudos futuros de reprodução.

Existem diferentes tipos de espermatozoides de peixes, e essa diversidade em parte está na forma da região da cabeça, no número, forma e localização das mitocôndrias nas diferentes espécies. A importância em se avaliar o diâmetro da cabeça e da peça intermediária, se dá pelo fato de na cabeça conter o DNA paterno, e, por outro lado, a peça intermediária contém as mitocôndrias que são responsáveis pela energia demandada durante o período de motilidade e viabilidade do espermatozoide (ANGRIMANI et al., 2015).

Assim, este trabalho vem contribuir de forma pioneira para preencher uma lacuna do conhecimento, estimando as dimensões de algumas partes dos espermatozoides de *P. mesopotamicus*, *P. brachyomus* e *C. macropomum* mediante uma técnica mais refinada de análise por microscopia eletrônica de varredura. Certamente que a relação entre a morfologia qualitativa e quantitativa dos espermatozoides com a dos ovócitos (p. ex., morfologia da micrópila) das três espécies e dos híbridos entre elas refletirá em resultados interessantes para o entendimento da biologia reprodutiva de tais espécies.

CONCLUSÃO

Os resultados revelam que os espermatozoides das três espécies diferem entre si na morfologia externa quanto ao tamanho e formato da cabeça, e nas proporções de comprimento da peça intermediária.

Um estudo futuro que objetive analisar as estruturas internas do espermatozoide das mesmas espécies abordadas nesse trabalho, feito com microscopia eletrônica de transmissão, somaria dados importantes na busca de informações que ajudem nas técnicas de reprodução artificial e hibridação nessas espécies.

AGRADECIMENTOS

Os autores externam seus agradecimentos à Universidade Federal de Lavras - UFLA, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES por proverem recursos para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.L.; VARELA, E.S.; MORO, G.V.; KIRSCHNIK, L.N.G. **Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014. 58 p. Embrapa Pesca e Aquicultura, Documentos, 3.
- ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; RUI, B.R.; BICUDO, L.C.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, p. 277-283, 2015.
- COSSON, J. Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella. In: ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.J.; COWARD K.; RAFIEE, G. (Eds.). **Fish spermatology**. UK, Alpha Science Intl. Ltd, 2008, p. 63-102.
- ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Species of Fishes by family/subfamily. **California: California Academy of Sciences**, 2009. Disponível em: < <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.html>. Acesso em: 26 fev. 2018.
- FELIZARDO, V.O.; MURAD, N.N.; MELO, C.C.V.; REIS, P.S.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, R.T.F. Influential Factors of Quality of Fish Gametes for Use of *In Vitro* Fertilization. **Journal of Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology**, v. 4, p. 1-3, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4172/2375-4508.1000166>
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa pecuária municipal: tabela 3940 - produção da aquicultura, por tipo de produto**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21>. Acesso em 26 fev.2018.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**: 2014. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. 197 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>. Acesso em 26 fev.2018.
- MARCOS, R.; POVH, J.A.; FORNARI, D. C.; DE OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; LOPERABARRERO, N. M.; MURARI, P. J. F. Weight gain and morphometric growth of genetically improved tambaqui *Colossoma macropomum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 2521-2527, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4Supl1p2521>
- MARIA, N.A.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; SILVA, C.A.; CARNEIRO, P.C.F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779-783, 2010. <http://10.1111/j.1439-0426.2010.01542.x>
- MURGAS, L.D.S.; DE JESUS PAULA, D.A.; MACHADO, M.R.F.; DE OLIVEIRA FELIZARDO, V.; DE SOUZA ANDRADE, E.; VERAS, G.C. Avaliação de parâmetros reprodutivos em peixes nativos. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. (eds) **Aquicultura no Brasil. Novas perspectivas**, São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. 441 p.
- PATZNER, R.A.; LAHNSTEINER, F. Sperm Morphology and Ultrastructure in Fish. In: ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.J.; COWARD K.; RAFIEE, G. (Eds.). **Fish spermatology**. UK, Alpha Science Intl. Ltd, 2008, p. 1-61.
- PESSOA, N.O.; GALVÃO, J.A.S.; DE SOUZA FILHO, F.G.M.; DE SOUSA, M.L.N.M.; SAMPAIO, C.M.S. Cooling of pirapitinga *Piaractus brachypomus* embryos stored at 10°C. **Zygote**, v. 23, p. 453-459, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000057>
- PSENICKA, M.; ALAVI, S.M.H.; RODINA, M.; GELA, D.; NEBESAROVA, J.; LINHART, O. Morphology and ultrastructure of Siberia sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. **Biology of the Cell**, v. 99, p. 103-115, 2007. <https://doi.org/10.1042/BC20060060>
- SANCHES, E.A.; BAGGIO, D.M.; PIANA, P.A.; SOUZA, B.E.; BOMBARDELLI, R.A. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1-6, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982011000100001>
- SOUZA, R.G.C.; ROCHA, M.M.; PONTUSCHKA, R.B.; BARREIROS, H.T. Effects of mechanical aeration on tambaqui farming *Colossoma macropomum* in excavated tanks. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, p. 113-119, 2015. DOI: 10.2312/ActaFish.2017.5.3.113-119
- STREIT, JR. D.P.; OLEVEIRA, A.C.; RIBIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M.; DIGMAYER, M. Motilidade, Vigor e Patologias Seminal *In natura* e Pós Criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim de Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 159-167, 2009.
- VERMA, D.K.; ROUTRAY, P.; DASH, C.; DASGUPTA, S.; JENA, J.K. Physical and Biochemical Characteristics of Semen and Ultrastructure of Spermatozoa in Six Carp Species. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 67-76, 2009.
- VIVEIROS, A.T.M.; ORFAO, L.H.; MARIA, N.A.; ALLAMAN, I.B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 293-300, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.025>