

MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DO ARIACÓ, *Lutjanus synagris*

Spermatic motility of the semen of lane snapper, *Lutjanus synagris*

Mayra Bezerra Vettorazzi¹, Erivânia Gomes Teixeira², Rossi Lelis Muniz Souza³,
José Renato de Oliveira César⁴, Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto⁵

RESUMO

A motilidade espermática é pré-requisito para a determinação da qualidade e capacidade de fertilização do sêmen em peixes, e diversos parâmetros têm sido usados para avaliá-la. O mais comum é a chamada duração da motilidade, que consiste no período entre a ativação espermática e a parada total da atividade. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o sêmen do ariacó, *Lutjanus synagris*, quanto ao comportamento do sêmen submetido ao resfriamento e à duração da motilidade espermática inicial. A motilidade espermática foi analisada através de dois tratamentos: TA-Gônadas à temperatura ambiente (25°C) e TR-Gônadas refrigeradas (4°C). A motilidade espermática foi observada a cada vinte minutos a partir da estocagem até completar três horas. A duração da motilidade foi aferida com cronômetro acionado juntamente com ativação das amostras frescas e o pH medido com fitas graduadas. A motilidade espermática média do sêmen resfriado foi 51,7%, enquanto que a armazenada à temperatura ambiente foi de 21,7%, sugerindo que a técnica de resfriamento prolonga a viabilidade espermática. A duração da motilidade espermática variou de 62 a 135s e foi considerada alta. O pH obtido foi 8,0.

Palavras-chaves: *Lutjanus synagris*, refrigeração de sêmen, motilidade espermática.

ABSTRACT

Spermatic motility is a first requisite for determining the quality and fertilizing ability of semen in fishes, and several parameters have been used to evaluate it. The most commonly parameter used has been the motility duration, which is the period between activation and stopping of sperm activity. The aim of this work was to characterize the semen of lane snapper, *Lutjanus synagris*, regarding its motility in fresh and refrigerated samples, and the motility period. The spermatic motility was analyzed through two treatments: TA-Gonads at room temperature (25°C) and TR-Refrigerated Gonads (4°C). For each treatment the spermatic motility was observed every twenty minutes during a three-hour time interval. The period of motility was accessed through stopwatch initiated together with the semen samples activation and the pH measured with graduated stripes. The mean spermatic motility percentage of the refrigerated gonads (TR, 4°C) in the first hour was 51.7% while the one for those room stored (TA, 25°C) was 21.7%. These results suggest that the refrigerating technique extends the spermatic viability. The period of motility fluctuated from 62 to 135s, which was regarded as a high value. The measured pH was 8.0.

Keywords: *Lutjanus synagris*, spermatozoa refrigeration, spermatic motility.

¹ Engenheira de Pesca, Mestranda do Curso de Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

² Engenheira de Pesca, Doutoranda em Engenharia de Pesca, Bolsista da CAPES.

³ Engenheiro de Pesca, Doutorando em Ciências Marinhas Tropicais, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da UFC.

⁵ Diretor do LABOMAR/UFC e Professor Associado do DEP/UFC.

INTRODUÇÃO

A aquicultura tem assumido crescente importância como fonte de alimentos ricos em proteína (Kime *et al.*, 2001), e no Brasil, em 2009, alcançou um volume de 415.649 t, sendo 78.296 t advindas da aquicultura marinha (MPA, 2010). Entretanto, o uso de um maior número de espécies em empreendimentos aquícolas implica também na necessidade de maiores investimentos em pesquisas para o desenvolvimento de “pacotes tecnológicos”, direcionados não apenas às espécies, mas também às diferentes regiões brasileiras (Ostrensky, 2008).

Um dos requisitos para o desenvolvimento do cultivo de novas espécies é a obtenção de ovos viáveis e confiáveis (Tucker, 1998). Visto que a desova de peixes mantidos em condições laboratoriais (muitas vezes bastante distintas das encontradas no ambiente natural) pode representar grande dificuldade, é desejável o uso de recursos tecnológicos de preservação de gametas (Kime, 2001).

A técnica de refrigeração possibilita a redução nos custos de manutenção do plantel de matrizes e trocas de material genético entre laboratórios (Carneiro *et al.*, 2006). A montagem de um banco genético com sêmen congelado de peixes é uma forma eficiente de reduzir os gastos com hormônios e direcionar a atenção às fêmeas durante os preparativos para a desova (Carneiro, 2007), uma vez que a conservação seminal em curto período de tempo permite que o sêmen esteja apto para a fecundação de ovócitos sem a presença do macho (Franciscatto *et al.*, 2002).

A motilidade espermática é pré-requisito para a determinação da qualidade e capacidade de fertilização do sêmen e diversos parâmetros têm sido usados para avaliá-la. O mais comum é a chamada duração da motilidade, que consiste no período entre a ativação espermática e a parada total da atividade (Billard, 1986; Ingermann *et al.*, 2002)

Durante a reprodução natural, a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozoides do trato genital do macho, no ambiente aquoso onde os espermatozoides encontram os componentes solúveis da água, principalmente íons e pH (Cosson, 2004; Stoss, 1983; Wojtczak *et al.*, 2007). É geralmente creditado à motilidade espermática o sucesso da fecundação de espécies ovulíparas (Gage *et al.*, 2004; Rudolfsen *et al.*, 2008).

Estudos com sêmen têm sido realizados com diferentes abordagens em mais de 32 espécies marinhas tais como salmão, *Oncorhynchus tshawytscha* e *Salmo solar* (Rosengrave, 2008; Gage *et al.*, 2002), esturção, *Acipenser sturio* e *A. persicus* (Kopeika *et al.*, 2000;

Noveiri *et al.*, 2006), robalo, *Centropomus undecimalis* (Tiersh *et al.*, 2004), garoupa, *Epinephelus marginatus* e *E. malabaricus* (Sanches *et al.*, 2008; Gwo 1993), e os vermelhos *Lutjanus campechanus*, *L. griseus*, *L. argentimaculatus* e *L. peru* (Riley *et al.*, 2004; Campos, 2006; Riley, 2008; Vuthiphandchai *et al.*, 2009).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o sêmen do ariacó quanto ao comportamento do sêmen submetido a resfriamento e à sua motilidade espermática inicial.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 19 exemplares de *L. synagris* foi capturado na costa do Ceará entre os meses de junho a outubro do ano de 2009, com linha de mão. Os animais permaneceram estocados durante 10 meses em tanque circular de 10.000 L, em sistema de recirculação de água, com aeração constante, iluminação artificial no Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Os peixes foram alimentados com ração semi-úmida formulada a 50% de concentrado protéico comercial específico para carnívoros adicionado de 50% de sardinha eviscerada.

Tempo de motilidade espermática

Foram selecionados 16 espécimes para a coleta. Cada amostra de sêmen foi coletada através de massagem abdominal no sentido antero-posterior em tubos de microcentrífuga com capacidade para 2 mL. A região urogenital foi seca utilizando papel toalha para evitar contato do sêmen com qualquer tipo de líquido (urina, água, muco), evitando assim sua ativação, e os animais envoltos com toalha úmida para evitar injúrias.

Para certificar a ausência de contaminação, uma alíquota de aproximadamente 5 µL de sêmen foi colocada sobre uma lâmina previamente focalizada em microscópio ótico comum com aumento de 400x e observada a ausência de motilidade pré-ativação. A motilidade espermática foi promovida pela adição de uma alíquota (10 µL) de água do sistema de cultivo com salinidade de 38‰ e a taxa pós-ativação foi determinada através da estimativa da taxa de espermatozoides móveis (Maria *et al.*, 2004). O tempo de duração da motilidade foi aferido através de cronômetro acionado logo após a ativação até que todas as células estivessem completamente inativas.

O sêmen de seis espécimes foi coletado para determinação do pH. Esta avaliação foi feita com o auxílio de fitas de pH. Uma alíquota de sêmen foi espalhada sobre uma lâmina e a fita medidora foi pressionada contra o esfregaço.

Comportamento do sêmen sob refrigeração

Foi realizado o resfriamento das gônadas separadas em seus lóbulos. Cada lóbulo recebeu tratamento individual, com acondicionamento sobre lâminas de vidro e recobertas com manta plástica de modo a evitar o contato direto com o ar e possível desidratação.

Foram delineados dois tratamentos: TA - Gônadas armazenadas em temperatura ambiente (25°C) e TR - Gônadas refrigeradas (4°C), para cada tratamento foi observada a motilidade espermática nos tempos 0h (controle) e a cada vinte minutos a partir da estocagem até completar três horas. Não foram adicionadas quaisquer soluções diluidoras.

A extração de sêmen foi realizada através de pressão do canal seminal com utilização de uma pinça cirúrgica sobre a lâmina a ser observada ao microscópio óptico. A ativação da motilidade espermática foi feita através da adição de uma alíquota de aproximadamente 3µL de água do tanque (38‰ de salinidade). O experimento foi feito em triplicata. A análise subjetiva estimou a taxa de espermatozoides móveis (Maria *et al.*, 2004) e foi realizada por um único observador.

Análise estatística

Os valores médios de motilidade espermática foram submetidos ao teste *t* presumindo variâncias diferentes, tendo-se utilizado o *software* Microsoft Office Excel® 2007, para o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Tempo de motilidade espermática

Várias técnicas de coleta de sêmen de peixes já foram descritas e no presente trabalho a coleta de sêmen com tubos de microcentrífuga de 2 mL foi realizada com sucesso comprovado pela ausência de contaminação do sêmen no momento da realização da coleta, não havendo necessidade de descartar nenhuma amostra. As taxas de motilidade do sêmen *L. synagris* variaram de 60% a 100% quando ativadas com água do sistema de cultivo. A duração da motilidade espermática variou de 62 a 135 segundos (Tabela I), faixa de variação provavelmente relacionada com as condições fisiológicas dos peixes.

O valor de pH registrado nas amostras analisadas foi 8,0.

Comportamento do sêmen sob refrigeração

A média de motilidade espermática do sêmen armazenado à temperatura ambiente (TA, 25°C) com 60 min de estocagem foi de 21,7% enquanto que em tem-

peratura resfriada (TR, 4°C) esta média foi de 51,7%. Não foi observada diferença significativa (Tabela II).

Tabela I - Peso, comprimento, taxa de motilidade e duração da motilidade de sêmen fresco do ariacó, *Lutjanus synagris*.

Espécime N°	Comprimento (cm)	Peso (g)	Motilidade espermática (%)	Duração da motilidade (s)
1	18,5	128,5	90	64
2	23,8	270,2	80	62
3	18,2	117,3	90	122
4	17,8	111,2	100	88
5	16,7	92,4	70	87
6	20,3	167,5	100	69
7	18,8	127,0	80	85
8	17,5	107,4	100	98
9	15,5	72,4	90	81
10	19,2	128,1	60	78
11	21,3	194,5	70	79
12	21,8	189,6	80	115
13	19,8	159,5	60	66
14	20,5	175,7	90	135
15	18,5	126,8	80	96
16	21,5	209,6	80	111
Média ± D.P.	19,4 ± 2,1	148,6 ± 50,5	82,5 ± 12,5	89,75 ± 21,0

Tabela II - Médias de motilidade espermática do sêmen de ariacó, *Lutjanus synagris*, submetido às temperaturas ambiente (TA=25°C) e resfriada (TR=4°C). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa.

Tempo	Motilidade espermática	
	% TA	% TR
T= 0	98,3	96,7
T= 20	91,7	68,3
T= 40	58,3	55,0
T= 60	21,7	51,7
T= 80	13,3	40,0
T=100	0,0	33,3
T=120	0,0	23,3
T=140	0,0	13,3
T=160	0,0	13,3
T=180	0,0	11,7
Média ± D.P.	28,3 ± 4,7 ^a	40,7 ± 16,7 ^a

A motilidade espermática decresceu com o passar do tempo, em ambos os tratamentos, porém em taxas menos elevadas no tratamento resfriado (Figura 1).

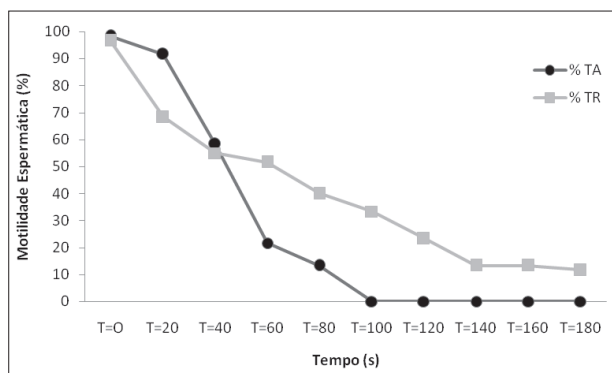


Figura 1 - Evolução das médias de motilidade espermática no sêmen do ariacó, *Lutjanus synagris*, submetido às temperaturas ambiente (TA, 25°C) e resfriada (TR, 4°C).

No tratamento TA (25°C), com motilidade espermática inicial de 98,3%, a motilidade nula foi observada aos 100s de sua estocagem, enquanto que no tratamento TR (4°C), com motilidade espermática inicial de 96,7%, aos 100s a motilidade observada foi de 33,3%. A viabilidade espermática foi observada durante as três horas de observação.

DISCUSSÃO

Outros métodos de coleta de sêmen já foram reportados para diversas espécies, tais como em siringa de 1mL e tubos de ensaio, porém existem riscos de contaminação por urina ou muco (Godinho *et al.* 2003; Murgas *et al.* 2007).

Valores semelhantes de motilidade espermática foram encontrados para o *Lutjanus campechanus* (variando entre 25% e 75%) (Riley *et al.*, 2004) e para *Lutjanus argentimaculatus* (variando de 20,0% a 82,2%) (Vuthiphandchai *et al.*, 2009), mas índices do sêmen podem variar no mesmo indivíduo (Luz *et al.* 2001). A motilidade espermática geralmente tem duração curta de tempo, após a qual o espermatozóide se torna incapaz de fertilizar o óvulo. Espermatozoides de salmão e truta nadam vigorosamente por menos de um minuto (Carneiro 2007; Gage *et al.* 2002), enquanto que em esturjões estes valores são maiores (170 e 222s, em *Polydon spathula* e *Scaphirhynchus platyrhynchus*, respectivamente) (Linhart *et al.*, 1995). Espécies de água doce como tilápia, dourado e piracanjuba produzem sêmen que apresentam motilidade de alguns minutos, ao passo que outras espécies tropicais nativas de interesse econômico como o pintado, o curimatá e o pacu apresentam tempo muito curto de motilidade, excedendo pouco mais de um minuto (Marques, 2001).

O pH utilizado para solução diluidora para sêmen de *L. argentimaculatus* foi de 7,9 (Vuthiphandchai *et al.*, 2009), bastante similar ao observado nestas análises. Como regra geral, o pH é tido como fator efetivo na ativação da motilidade espermática dentro do ducto espermático (Miura *et al.* 1991; Nagahama, 1987; Yaron, 1995). A motilidade espermática em esturjões é otimizada, aparentemente, quando em pH 8,0 e reduzida quando valores mais baixos, sugerindo a importância do controle desta variável na ativação da motilidade (Gallis *et al.* 1991; Cosson & Linhart, 1996; Alavi *et al.* 2004).

A média de pH do sêmen fresco estimada para salmão, *Oncorhynchus tshawytscha*, foi de 8,5 (Rosengrave *et al.*, 2008), porém outros autores apontam valores entre 7,0 e 8,5 (Nomura 1964; Inaba *et al.*, 1958; Baynes 1981; Robitaille *et al.*, 1987; Morisawa & Morisawa 1988).

O sêmen proveniente de gônadas resfriadas de *Lutjanus campechanus* e *L. peru* também decresce em motilidade espermática com o passar dos dias (Riley, 2002; Campos, 2006). Em *Centropomus undecimalis* o mesmo se observa, porém com valores acima de 50% em amostras diluídas em Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) e NaCl, por até 9 dias, enquanto que as preservadas sem diluidores perderam totalmente a motilidade em menos de 2 dias (Tiersch *et al.*, 2004). A diluição aumenta a disponibilidade de oxigênio para as células e também reduz a concentração de proteínas do plasma seminal que podem degenerar com o tempo, comprometendo a qualidade seminal (Billard & Cosson, 1992).

Estudos mais complexos já foram realizados para outras espécies de lutjanídeos (Roppolo, 2000; Riley *et al.*, 2004; Vuthiphandchai *et al.*, 2009), analisando a motilidade espermática em sêmen criopreservado em espécimes *in vivo* e *post mortem*, porém poucas informações sobre *L. synagris* estão disponíveis sob o ponto de vista da biotecnologia aplicada à aquíicultura.

Apesar das inúmeras aplicações apontadas ao longo de mais de 50 anos de pesquisa (Blaxter, 1953; Gwo 1993; Suquet *et al.*, 1994; Bromage 1995; Rana, 1995; Ohta & Izawa, 1996; Tabata & Mizuta, 1997), os resultados das análises de sêmen devem ser acompanhados de estudos de taxa de fertilização, larvicultura e sobrevivência para que possam de fato surtir efeito econômico nos estabelecimentos de cultivo. Essa abordagem mais aplicada seria favorecida pela parceria entre laboratórios e entre os setores público e privado.

CONCLUSÕES

Os resultados permitiram concluir que a técnica de preservação por resfriamento prolonga a viabilidade espermática do sêmen, em relação àquela do sêmen mantido à temperatura ambiente. As médias de motilidade espermáticas observadas em sêmen refrigerado indicam que é possível a manipulação de material espermático por cerca de duas horas.

O tempo de vida do espermatozóide de *L. synagris* é consideravelmente alto o que pode interferir de forma positiva em manejos praticados na aquíicultura. Também sugerem que espécimes de ariacó com peso médio de 148,6 g produzem sêmen com qualidade comprovada pela boa taxa de motilidade espermática.

O valor do pH, estimado em 8,0, indica que possíveis crioprotetores a ser utilizados devem seguir o mesmo padrão de potencial hidrogeniônico garantindo a inatividade das amostras durante a preservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alavi, S.M.H. *et al.*, Chemical composition and osmolarity of seminal plasma of *Acipenser persicus*, their physiological relationship with sperm motility. *Aquac. Res.*, v.35, p.1238-1243, 2004.
- Baynes, S.M.; Scott, A.P. & Dawson, A.P. Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: effects of cations and pH in motility. *J. Fish Biol.*, v.19, p.259-257, 1981.
- Billard R., Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, *Reprod. Nut. Dev.*, v.2, p.877-920, 1986.
- Billard, R. & Cosson, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exper. Zool.*, v.261, p.122-131, 1992.
- Blaxter, J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring, p.183-194, in Riley, K.L.(ed.), *Cryopreservation of sperm of red snapper (Lutjanus campechanus)*. *Aquaculture*, v.238, 2004.
- Bromage, N. Broodstock management and seed quality-general considerations, p.1-25, in Bromage, N.R & Roberts, R.J. (eds.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- Campos, V.T.P. *Inducción a la ovulación y espermiogéneis em el huachinango del Pacífico Lutjanus peru (Nichols y Murphy, 1922) y almacenamiento de su sêmen*. Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Mestrado em Ciências em Manejo de Recursos Marinos, Instituto Politécnico Nacional, 96 p., La Paz, 2006.
- Carneiro P.C.F.; Segui M.S.; Ióris-Filho C.R. & Mikos J.D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Rev. Acad.*, v.4, n.3, (no prelo), 2006.
- Carneiro, P.C.F. Tecnologia de produção e armazenamento de sêmen de peixes, *Rev. Bras. Rep. Anim.*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, 2007.
- Cosson, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture*, v.12, p.69-85, 2004.
- Cosson, J. & Linhart, O. Paddlefish, *Polyodon spathula*, spermatozoa: effects of potassium and pH on motility. *Fol. Zool.*, v.45, p.361-370, 1996.
- Franciscatto, R. *et al.* Qualidade do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* e taxa de fertilidade após o resfriamento. *Rev. Bras. Rep. Anim.*, v.26, p.213-215, 2002.
- Gage, M.J.G. *et al.* Relationships between sperm morphology and sperm motility in the Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, v.61, p.1528-1539, 2002.
- Gage, M.J.G.; Macfarlane, C.P., Yeates, S.; Ward, R.G.; Searle, J.B. & Parker, G.A., Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr. Biol.*, v.14, p.44-47, 2004.
- Gallis, J.L. *et al.* Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, 143-151, in Williot, P. (ed.), *Ph, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility*. *Acipenser*, Bordeaux, 1991.
- Godinho, H.P.; Amorim, V.M.C. & Peixoto, M.T.D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. *Rev. Bras. Zoot.*, v.32, p.1537-1543, 2003.
- Gwo, J.C. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa (Teleost, Perciformes, Aparidae). *Theri.*, v.39, p.1331-1342, 1993.
- Inaba, D.; Nomura, M. & Suyama, S. Studies on the improvement of artificial propagation in trout culture. II. On the pH values of eggs milt, celomic fluids and others. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, v.23, p.162-165, 1958.
- Ingerman, R.L., *et al.* Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J. Exper. Biol.*, v.205, p.2885-2890, 2002.
- Kime, D.E., *et al.* Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.130, p.425-433, 2001.
- Kopeika, E.F.; Williot, P. & Goncharov, B.F. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, v.16, p.167-173, 2000.
- Linhart, O.; Mims, S.D. & Shelton, W.L. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus*, and paddlefish, *Polyodon spathula*. *J. Fish Biol.*, v.47, p.902-909, 1995.
- Luz, R.K., *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v.27, p. 39 - 42, 2001.
- Maria, A.N.; Murgas, L.D.S.; Silva, M.O.B.; Miliorini, A.B.; Franciscatto, R.T. & Logato, P.V.R., Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piractus mesopotamicus* - Holmberg, 1887), *Ciênc. Agron.*, Lavras, v.28, n.1, p.191-194, 2004.
- Marques, S. *Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

- Miura, T. *et al.* The role of hormone in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J. Exper. Zool.*, v.261, p.359-363, 1991.
- Morisawa, S., Morisawa, M. Induction of potencial for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *J. Exper. Biol.*, v.136, p.13-22, 1988.
- MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. *Produção Pesqueira e Aquícola: Estatística 2008 e 2009*. Brasília, 29 p., 2010.
- Murgas, L.D.S. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Rev. Bras. Zoot.*, v.36, n.3, p. 526-531, 2007.
- Nagahama, Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads, *Zool. Sci.*, v.4, p.209-222, 1987.
- Nomura, M. Studies on the reproduction of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to egg taking. IV. The activation of spermatozoa in different and preservation of semen. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, v.30, p.723-733, 1964.
- Noveiri, S.B. *et al.*, Sperm morphometry, density and spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), *J. Appl. Ichthyol.*, v.22, 380-383, 2006.
- Ohta, H. & Izawa, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, v.142, p.107-118, 1996.
- Ostrensky, A.; Borguetti, J.R. & Soto, D. *Aquicultura no Brasil, o desafio é crescer*. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 276 p., Brasília, 2008.
- Rana, K. Preservation of gametes, p. 88-94, in Bromage, N.R. & Roberts, R.J. (ed.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge University Press, 1995.
- Riley, K.L. *Refrigerated storage and cryopreservation of sperm for the production of red snapper and snapper hybrids*. Master's Thesis, School of Renewable Natural Resources, University of North Carolina at Wilmington, 192 p., Wilmington, 2002.
- Riley, K.L. *et al.* Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, v.238, p.183-194, 2004.
- Riley, K.L.; Chesney, E.J. & Tiersh, T.R. Field collection, handling, and refrigerated storage of sperm of red snapper and gray snapper. *North Amer. J. of Aquac. Sci.*, v.70, p.356-364, 2008.
- Robitaille, P.M.L; Munford, K.G. & Brown, G. P³¹ nuclear magnetic resonance study of trout spermatozoa at rest after motility and during short term storage. *Biochem. Cell Biol.*, v.65, p.474-485, 1987.
- Roppolo, G.S. *Techniques for the commercial-scale production of cryopreserved sperm from aquatic species*. Master's Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, 2000.
- Rosengrave, P. *et al.* Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. *Comp Biochem. Physiol.*, v.152, p.123-129, 2008.
- Rudolfsen, G.; Figenschou, L.; Folstad, I. & Kleven, O. Sperm velocity influences paternity in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.*, v.39, 212-216, 2008.
- Sanches, G.E.; Oliveira, I.R. & Serralheiro, P.C.S., Criopreservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Bioikos*, v.22, p.81-90, 2008.
- Stoss, J., Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. *Fish Physiol.*, v.9, p.305-350, 1983.
- Suquet, M. *et al.* Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquat. Liv. Res.*, v.7, p.283-294, 1994.
- Tabata, K. & Mizuta, A., Cryopreservation of sex reversed gynogenetic females sperm in hirame. *Fish. Sci.*, v.63, p.482-483, 1997.
- Tiersch, T.R. *et al.*, Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomun undecimalis* (Bloch), *Aquac. Res.*, v.35, 278-288, 2004.
- Tucker Jr., J.W. *Marine fish culture*. Kluwer Academic Publishing, Boston, 750 p., 1998.
- Vulthiphandchai, V.; Chomphuthawach, S. & Nimrat, S., Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity, *Ther.*, v.72, p.129-138, 2009.
- Wojtczak, M. *et al.* Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture*, v.270, p.259-264, 2007.
- Yaron, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, v.129, p.49-73, 1995.