**CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE NEOMACHOS DE *Rhamdia quelen***

**Vanessa Martins da Rocha1\*; Susan Kelly Rodrigues de Sousa2; Jurandir Joaquim Bernardes Júnior3; Luciano Augusto Weiss4; Alex Pires de Oliveira Nuñer5.**

1vanessa.engenhariapesca@gmail.com. Mestranda em Aquicultura/ UFSC. 2chaveiro.susan@gmail.com. Mestranda em Aquicultura/ UFSC. 3jurandirjbjr@gmail.com. Doutor em Aquicultura/UFSC. 4luciano@lapad.ufsc.br. Doutor em Aquicultura/UFSC. 5alex.nuner@ufsc.br. Docente Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC.

**RESUMO**

 O objetivo deste estudo foi caracterizar a qualidade do sêmen de neomachos de jundiá, *Rhamdia quelen*, através de parâmetros qualitativos e quantitativos. O sêmen foi coletado e caracterizado através do volume e concentração do sêmen, motilidade, morfologia e integridade dos espermatozoides, espermatócrito e taxa de fertilização e posteriormente comparado ao sêmen de machos genotípicos utilizando análise estatística. Na coleta realizada em setembro/2016, neomachos apresentaram qualidade do sêmen similar à de machos genotípicos, mas apresentaram espermatozoides com menor porcentagem de células (p < 0,05) com morfologia normal (69,0 ± 10,0%) e menos viáveis a fertilização (47,6 ± 20,5). Diferenças encontradas no sêmen indicaram que o tratamento hormonal usado para a inversão do sexo afetou a qualidade dos espermatozoides. No entanto, neomachos de *Rhamdia quelen* apresentaram liberação do sêmen da mesma forma que os machos genotípicos, sendo capazes de realizar a fecundação dos ovócitos e gerar descendentes.

**Palavras-chave:** Aquicultura. CASA. Concentração. Morfologia de espermatozoides. Taxa de fertilização.

**ABSTRAT**

E The objective of this study was to characterize the semen quality of jundiá neomales, *Rhamdia quelen*, through qualitative and quantitative parameters. Semen was collected and characterized by the volume and concentration of semen, motility, morphology and sperm integrity, spermatocrit and fertilization rate and later compared to semen of genotypic males using statistical analysis. In the sampling made in September/2016, neomales presented semen quality similar to that of genotypic males, but presented spermatozoa with a lower percentage of cells (p < 0.05) with normal morphology (69.0 ± 10.0%) and less viable fertilization (47.6 ± 20.5). Differences in semen indicated that the hormonal treatment used to sex inversion affected sperm quality. However, neomales of *Rhamdia quelen* presented release of semen in the same way as genotypic males, being able to perform oocyte fertilization and generate offspring.

**Key words:** Aquaculture. CASA. Concentration. Fertilization rate. Sperm morphology.

1. **INTRODUÇÃO**

O crescimento heterogêneo de machos e de fêmeas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), compromete o cultivo da espécie, pois os machos crescem menos que as fêmeas (BALDISSEROTO, 2004). Desse modo, o cultivo monossexo de fêmeas pode vir a ser uma alternativa para a produção de lotes mais homogêneos e para intensificar a produção desta espécie (AMARAL-JUNIOR, 2008a), que vem crescendo na região Sul do Brasil, por ser uma espécie nativa que apresenta bom desempenho produtivo, adaptabilidade às condições climáticas e cujo processo reprodutivo em piscicultura está dominado (BOMBARDELLI et al., 2006).

A reversão sexual indireta é uma técnica de produção de lotes monossexo de fêmeas, que consiste na masculinização de fêmeas genotípicas com hormônio androgênico, resultando em uma descendência com machos genotípicos e fêmeas invertidas, os chamados neomachos. Posteriormente é realizado o cruzamento dos neomachos com fêmeas normais, dando origem a uma descendência teoricamente 100% feminina, e livre de hormônios (REIS et al., 2016).

Todavia, há pouca informação disponível sobre a qualidade do sêmen de neomachos, principalmente de espécies nativas. Estudos mostram neomachos com gônadas apresentando estruturas atrofiadas (RADOSLAW et al., 2011) ou produzindo sêmen de baixa qualidade (RODINA et al., 2008), o que poderia comprometer a reprodução.

Nesse contexto, a avaliação do sêmen dos neomachos é necessária para predizer o potencial reprodutivo e identificar a viabilidade do uso desses animais na reprodução comercial por meio da descrição do perfil espermático dos reprodutores e da avaliação da qualidade do sêmen coletado (SANCHES et al., 2011 a,b).

Para a descrição de um perfil espermático, parâmetros qualitativos e quantitativos são utilizados na análise das características físicas do sêmen (ROUTRAY et al., 2007), sendo as principais o volume e a concentração do sêmen, a morfologia dos espermatozoides, a taxa de motilidade espermática e a integridade da membrana (SOLIS-MURGAS et al., 2011;; ZANIBONI-FILHO e BALDISSEROTO, 2015), além da taxa de fertilização.

 Entre os parâmetros mencionados, a motilidade apresenta influência relevante na fertlização. No intuito de reduzir a subjetividade nas análises de motilidade, sistemas automáticos como o CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) têm sido cada vez mais utilizados (ARRUDA et al., 2011).

Os sistemas computadorizados fornecem dados precisos sobre as características do movimento espermático, o que possibilita a obtenção de informação da velocidade espermática de cada espermatozoide, através da análise integrada de imagens digitalizadas (ZANIBONI-FILHO e BALDISSEROTO, 2015).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen*, comparando-o com o sêmen de machos genotípicos, por meio dos principais parâmetros de qualidade do sêmen.

# 2- MATERIAL E MÉTODOS

### *Delineamento Experimental*

O presente estudo analisou, individualmente, o sêmen de neomachos e o sêmen de machos genotípicos de *Rhamdia quelen* em três momentos: setembro/2016, abril/2017 e junho/2017. Os neomachos de *R. quelen* utilizados nesse estudo foram produzidos por Weiss (2016), que identificou os animais através de teste de progênie.

Em setembro/2016 o sêmen de três neomachos (481,7 ± 265,8 g) e o sêmen de três machos normais (376,7 ± 107,7 g) foram individualmente caracterizados pelas variáveis: volume e concentração espermática, espermatócrito, morfologia espermática, motilidade e integridade da membrana dos espermatozoides, além da taxa de fertilização, seguindo-se os procedimentos estabelecidos no Protocolo PP00788, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFSC.

Nestes estudos todos os reprodutores neomachos e machos eram meio-irmãos e apresentavam idade aproximada de três anos.

Os peixes foram estocados em tanques ligados a um sistema de recirculação de água, com temperatura e luz controladas, e alimentados com ração comercial (Guabi Pirá® pellets de 2-4 mm) com 40% de proteína bruta, que foi oferecida duas vezes ao dia e três vezes por semana.

### *Hipofisação dos reprodutores e coleta do sêmen*

Os animais aptos para a reprodução foram induzidos com extrato pituitário de carpa (EPC), utilizando-se duas doses em fêmeas (0,5 e 4,5 mg/kg), com intervalo de 12 h e uma dose em neomachos e machos genotípicos (2,0 mg/kg) aplicada no momento da segunda dose das fêmeas.

Os gametas foram liberados com 220 horas-grau, após a aplicação da segunda dose, na temperatura da água de 24,8 ºC.

Nos neomachos e nos machos genotípicos, o sêmen foi coletado individualmente até a redução aparente (SANCHES et al., 2011a) com o uso de seringas plásticas, evitando-se a contaminação com água, sangue, fezes ou urina. Após a coleta as seringas foram armazenadas em caixas térmicas contendo gelo reutilizável. No momento da coleta avaliou-se a coloração e o aspecto do sêmen, de modo subjetivo.

### *Volume*

O volume foi aferido com o uso de seringa plástica de 5,0 mL. Posteriormente, o sêmen foi transferido para eppendorfs de 3,0 mL para a realização das análises.

### *Concentração espermática*

Nesta análise uma alíquota de 10 μL de sêmen *in natura* foi diluída (1:100, sêmen:volume total) em solução de formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4,0 mL de formaldeído a 35% e 100 mL de água destilada). Em amostras muito concentradas uma alíquota de 1,0 μL do volume foi novamente diluída em 999 μL (1:1000) para facilitar a contagem.

A concentração espermática foi determinada através da contagem do número de espermatozoides (espermatozoides/mL) em câmara hematimétrica de Neubauer. Na câmera de Neubauer foi adicionado 1,0 μL do sêmen diluído, sendo contados os espermatozoides presentes em cinco quadrículas, sendo a concentração calculada conforme CBRA (1998).

### *Espermatócrito*

A mensuração do espermatócrito foi realizada com o sêmen fresco utilizando-se tubos capilares de micro-hematócrito, que foram preenchidos com aproximadamente 70% de sêmen e vedados em uma das extremidades.

 Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 15 min, em uma microcentrífuga (centrífuga - CENTRIBIO Hematocrit®). O percentual de massa celular presente no sêmen foi mensurado com o auxílio de uma régua.

### *Morfologia espermática*

Inicialmente uma alíquota de 10 μL de sêmen foi diluída em solução de formol-citrato (1:100, sêmen:volume total). Posteriormente, a 1,0 μL desta solução diluída foram adicionados 40 μL de corante rosa bengala.

Para análise da morfologia dos espermatozoides, uma alíquota de 1,0 μL de sêmen corado foi colocada sobre lâmina para realização de esfregaço.

Depois de seco, o esfregaço foi observado em microscópio de luz para contagem (*n*=200) e a classificação dos espermatozoides em normais ou com presença de anormalidades.

As anormalidades morfológicas foram classificadas em primárias, quando os espermatozoides apresentavam cauda dobrada, enrolada, curta, curvada e/ou dupla e cabeça pequena e/ou grande, ou em secundárias, quando os espermatozoides apresentavam cauda tipo gancho, ausência de cabeça e/ou cauda solta.

### *Motilidade espermática*

A motilidade espermática foi avaliada através do sistema CASA, utilizando-se 1,0 μL de sêmen, que foi diluído em solução ativadora de bicarbonato de sódio (NaHCO3) a 1,0%. Para os machos normais, a diluição foi de 1:1000 (sêmen/solução), e para os neomachos foi de 1:200, devido ao menor número aparente de células.

Na sequência, 10 μL do sêmen diluído foram colocados em câmera de Neubauer e a motilidade foi gravada em vídeos com duração de 60 s, a uma taxa de 100 quadros, utilizando-se um microscópio de luz (objetiva de 400X), ao qual acoplou-se a uma câmera CCD com objetiva de contrataste de fases ligada a um microcomputador.

A gravação, a compilação das imagens e a análise dos vídeos produzidos no CASA utilizando o software Image J seguiu o protocolo proposto por Kime et al. (2001), já validado para *R. quelen* por Sanches et al. (2010a).

As variáveis avaliadas foram o percentual de motilidade (%), a velocidade curvilinear (VCL), a velocidade média de deslocamento (VAP), a velocidade em linha reta (VSL) e a Linearidade (LIN) no tempo de 10 s, sendo o procedimento realizado em triplicata para cada amostra de sêmen de neomachos e de machos.

### *Integridade da membrana*

O percentual de espermatozoides com membrana celular íntegra foi quantificado pelo método de coloração eosina/nigrosina (3,0% e 5,0%, respectivamente).

Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi corada com 50 μL de nigrosina e 30 μL de eosina e em seguida foi realizado um esfregaço com uma alíquota de 1,0 μL da mistura. O procedimento foi similar ao realizado por SANCHES et al. (2011b) tendo sido alteradas apenas as dosagens de sêmen (30 μL), dos corantes (90 μL) e do esfregaço (10 μL).

Em microscópio de luz (Leica DMLB, 100 X), foram contados 200 espermatozoides, para os quais foram considerados como não íntegros aqueles cujas células apresentaram coloração rosada, ou seja, que absorveram os corantes, e como íntegros os que apresentaram células não coradas, cujas membranas íntegras impediam a penetração dos corantes.

### *Taxa de fertilização*

Em setembro de 2016, para cada sêmen de neomachos e de machos genotípicos foram utilizados 2,0 g de ovócitos de uma fêmea (830 g) de *R. quelen*, cujo os ovócitos, após coleta manual foram fertilizados por uma alíquota de 50 μL de sêmen proveniente de cada reprodutor.

O procedimento de fertilização foi realizado em triplicata com o sêmen individual de cada animal e os ovos, após a fertilização, foram distribuídos em incubadoras cilíndrico-cônicas de 10 L abastecidas por um sistema de recirculação de água com temperatura de 25 oC.

A taxa de fertilização dos cruzamentos envolvendo neomachos e os machos, nos meses de setembro e abril, foi quantificada dez horas após a fecundação, através da amostragem de 260 ovos de cada incubadora que foram observados em microscópio de luz (ZANIBONI-FILHO, 1992), considerando-se como viáveis, os ovos em estágio de fechamento do blastóporo completo.

### *Análise Estatística*

As variáveis espermáticas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney, aplicado para comparação de neomachos e machos genotípicos de *R. quelen*. Os dados referentes aos parâmetros espermáticos foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.

# 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal dos animais, o volume seminal obtido e a produção relativa de sêmen produzido por neomachos e machos genotípicos de *R. quelen* nas três coletas realizadas estão apresentados na Tabela 1.

O volume de sêmen produzido por neomachos em setembro/2016 não apresentou diferença em relação ao volume produzido por machos genotípicos (p > 0,05), mas a amplitude mostra uma variação no volume liberado de sêmen nos neomachos em relação aos machos. A produção de sêmen em relação ao peso dos animais foi superior em machos em set/2016.

De acordo com Viveiros e Godinho (2009), o volume de sêmen é muito variável em peixes teleósteos, e pode ser alterado de acordo com o peso do indivíduo, da época e da metodologia de coleta.

O volume de sêmen relativo ao peso dos animais produzido por neomachos e machos genotípicos, foi inferior ao registrado para *R. quelen* (0,036 ± 0,008 mL/g) por Bombardelli et al. (2006).

**Tabela 1.** Peso corporal (g), volume (mL) e produção relativa de sêmen (mL/g) (média ± desvio padrão) de neomachos e machos genotípicos de *Rhamdia quelen*. A amplitude está apresentada entre parênteses.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Período | Tipo | Peso (g) | Sêmen |
| Volume (mL) | Produção (mL/g) |
| Setembro2016 | Neomachos | 481,7±265,8 (270 – 780) | 3,7±4,4 (1,1 - 8,8) | 0,008 |
| Machos | 376,7±107,7 (265 – 480) | 10,0±2,0 (7,8 - 11,8) | 0,027 |

Os valores das demais varáveis analisadas para o sêmen de neomachos e machos genotípicos de *Rhamdia quelen* em setembro/2016 estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Variáveis espermáticas analisadas no sêmen de neomachos (n=3) e de machos genotípicos (n=3) de *Rhamdia quelen* (média ± desvio padrão) em setembro/2016. VCL = Velocidade curvilinear; VAP = Velocidade da trajetória média; VSL = Velocidade linear progressiva. LIN = Linearidade.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Variável espermática | Neomachos | Machos |
| Concentração (spz/mL) | 1,1x1011 ± 1,9x1011 | 2,4x1011 ± 3,9x1010 |
| Espermatócrito (%) | 18,8 ± 18,7 | 25,5 ± 7,2 |
| Normalidade morfológica (%) | 69,0 ± 10,0\*\* | 86,3 ± 3,5 |
| Motilidade (%) | 75,0 ± 0,2\* | 75,0 ± 0,1 |
| VCL (µm/s) | 82,7 ± 4,4\* | 80,8 ± 7,9 |
| VAP (µm/s) | 68,9 ± 4,9\* | 67,9 ± 7,6 |
| VSL (µm/s) | 61,7 ± 5,8\* | 61,9 ± 6,8 |
| LIN (%) | 90,0 ± 0,03\* | 91,0 ± 0,03 |
| Integridade de membrana (%) | 70,8 ± 33,6 | 81,3 ± 8,1 |
| Taxa de fertilização (%) | 47,6 ± 20,5\*\* | 75,2 ± 4,6 |

\*Um dos neomachos não apresentou motilidade, velocidades e LIN pelo CASA.

\*\* Diferença estatística pelo Teste de Mann-Whitney.

Em setembro/2016, a concentração espermática do sêmen de neomachos não diferiu de machos (p > 0,05), embora neomachos tenham apresentado um sêmen menos concentrado. O espermatócrito do mesmo modo, não diferiu entre neomachos e machos genotípicos (Tabela 2).

Neomachos e machos genotípicos apresentaram a mesma motilidade, sendo que as diferentes velocidades espermáticas e a linearidade foram semelhantes entre os dois grupos de peixes analisados. A integridade da membrana também não apresentou diferenças entre os dois grupos avaliados (Tabela 2).

A presença de ductos espermáticos em neomachos de jundiá (WEISS, 2016) permitiu obter valor acima de 70% para a motilidade, em setembro. Fitzpatricka et al., (2005) observaram em *Oncorhynchus kisutch*, menor proporção de espermatozoides móveis em sêmen coletado dos testículos de neomachos, cujo ductos espermáticos apresentavam desenvolvimento incompleto.

Sanches et al. (2010a,b), utilizando o software CASA para o jundiá encontraram no intervalo de 10-12 s e aos 15 s após a ativação 69,9 ± 2,5% e 65,4 ± 13,6% de motilidade, respectivamente.

O uso de sistemas computadorizados para avaliação espermática tem mostrado que as velocidades, assim como a motilidade, também apresentam correlação positiva com a fertilidade dos peixes (VIVEIROS et al., 2010), sendo que espermatozoides mais rápidos tendem a apresentar maior fertilização (GALLEGO et al., 2013).

Velocidades próximas às observadas para neomachos e machos genotípicos, foram descritos para o jundiá por Sanches et al. (2010a) no intervalo de tempo de 10-11 s após a ativação, respectivamente 84,0 ± 1,7; 77,3 ± 1,7 e 70,3 ± 1,5 µm/s para a VCL, VAP e VSL. Porém, foram maiores que as velocidades também observadas para o jundiá por Sanches et al. (2010b) aos 15 s (77,5 ± 15,0; 58,7 ± 9,0 e 46,5 ± 6,6 µm/s), e aos 35 s (66,4 ± 16,1; 42,4 ± 10,5 e 34,3 ± 7,9), após a ativação, para a VCL, VAP e VSL.

Neste estudo, foi considerado que os espermatozoides de neomachos apresentaram-se como rápidos, mesmo não apresentando altas taxas de fertilização, fato que pode estar relacionado com a perca da viabilidade dos espermatozoides de jundiá de acordo com o tempo após a ativação (SANCHES et al., 2010b).

Sanches et al. (2015), encontrou para Steindachneridion parahybae relação negativa entre a linearidade e a motilidade, presumindo que movimentos aleatórios ou circulares resultam em alta motilidade, mas quando predominam espermatozoides com movimento reto a motilidade é baixa, podendo influenciar negativamente na fertilização. Apesar de não ter sido observado para neomachos de *R. quelen* em setembro/2016, influência da linearidade sobre a motilidade dos espermatozoides foi observado baixa fertilização.

Os neomachos de *R. quelen*, apresentaram espermatozoides com menor porcentagem de células com morfologia normal e com menor efetividade na fecundação dos ovócitos (p < 0,05), em comparação aos valores obtidos para machos genotípicos (Tabela 2).

A baixa taxa de fertilização, registrada para neomachos de Jundiá (47,6 ± 20,5%) em setembro foi próximaà encontrada por Rodina et al. (2008) para neomachos de *Perca fluviatis* L*.* (42,5%), mas ao contrário do resgistrado por esses autores, no presente estudo houve diferença em relação a taxa de fertilização de neomachos e de machos genotípicos.

A elevada integridade da membrana dos espermatozoides de neomachos e de machos genotípicos foi similar ao valor observado por Bombardelli et al. (2006) para *R. quelen*.

De acordo com Sanches et al. (2011b) a determinação da integridade apresenta importantes implicações para o número total de espermatozoides viáveis produzidos por um reprodutor, o que possibilita a seleção e manutenção de estoque de animais com maior potencial reprodutivo. No entanto, apenas esta avaliação para a identificação de um futuro reprodutor não é segura, pois os espermatozoides mesmo apresentando membrana íntegra, podem apresentar defeitos morfológicos que comprometem a fertilização.

Segundo Melo-Maciel et al. (2012) a morfologia espermática está diretamente relacionada ao potencial fertilizante dos espermatozoides, e pode auxiliar na definição da qualidade seminal. Solis-Murgas et al. (2011) ressaltaram a importância da avaliação da morfologia de espermatozoides, para explicar o insucesso de reprodutores tidos como aptos à reprodução, após análises convencionais de motilidade.

Os resultados sugerem que os neomachos apresentaram sêmen similar ao de machos genotípicos, mas diferenças encontradas para a taxa de fertilização e normalidade morfológica indicam que o tratamento hormonal usado para a inversão do sexo afetou a qualidade dos espermatozoides.

**4- CONCLUSÃO**

Neomachos de *Rhamdia quelen* apresentaram liberação do sêmen da mesma forma que os machos genotípicos, e seu sêmen foi capaz de realizar a fecundação de ovócitos e gerar descendentes, apesar de apresentar menor porcentagem de espermatozoides normais.

# 5- AGRADECIMENTOS

Ao Jurandir Bernardes pela contribuição com as análises de motilidade do CASA, a Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

# 6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BALDISSEROTO, B. **Biologia do jundiá**. In: BALDISSEROTO, B.; RADÜNZ NETO, J. (Eds.) **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.

AMARAL-JUNIOR, H. NUNES, M. F. S.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 9, n. 12, dez. 2008a.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

BOMBARDELLI, R. A. MORSCHBACHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1251-125, 2006.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

FITZPATRICKA, J. L. HENRY, J. C.; LILEY, N. R.; DEVLIN, R. H. Sperm characteristics and fertilization success of masculinized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 249, p. 459-468, 2005.

GALLEGO, V. PÉREZ, L.; ASTURINO, J. F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). **Aquaculture,** vol. 416, p. 238-243, 2013.

KIME, D. E. VAN LOOK, K. J.; McALLISTER, B. G; HUVSKENS, G.; RURANGWA, E. OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 425-433, dez. 2001.

MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITOVANDERLEY, C. S. B.; LEITE. L. V.; OLIVEIRA, C. E; OLIVEIRA, M. S.; LOPES, J. T.; NUNES, J. F. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. **Ciência Animal,** Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 269-283, jun. 2012. Edição Especial.

KOWALSKI, R. K.; SAROSIEK, B.; DEMIANOWICZ, W.; JUDEK, J.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H.; DEMSKA-ZAKÉS, D. BABIAK, I; GLOGOWSKI, J. Quatitative characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Neo-Males (XX Genotype) and Super-Males (YY Genotype) Sperm. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 5, n. 5, 2011.

REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L.; PIFERRER, F. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Anima**l**,** Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 22-28, jan./mar. 2016.

RODINA, M.; POLICAR, T.; LINHART, O. Cryopreservation of sperm of testicular neomales and stripped normal males of European perch (*Perca fluviatilis* L.). **Cybium**, v. 32, n. 2, 2008.

SANCHES, E. A; BOMBARDELLI, R. A.; MARCOS, R. M.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C. P. R.; ROMAGOSA, E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research,** v. 42, n. 1, p. 153-156, 8 out. 2010b.

SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M.; TESSARO, L.; BALEN, R. E.; BOMBARDELLI, A. R. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 40, n. 6, p. 1163-1167, jul. 2011a.

SANCHES, E. A. SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SYKORA, R. M.; XAXIER, A. M. M. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 357-362, jul./set. 2011b.

SANCHES, E. A.; OKAWARA, R. Y.; CANEPPELE, D. TOLEDO, C. P. R.; BOMBARDELLI, R. A.; ROMAGOSA, E. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112h of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 79-88, 2015.

SOLIS-MURGAS, L. D.; FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, E. S.; VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, abr. 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150. 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; ÓRFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater ﬁsh streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v. 74, p. 551-556, 2010.

WEISS, L. A. Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1924): masculinização com 17α-metiltestosterona e feminização indireta. 2016. 117 f. **Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-graduação em Aquicultura – UFSC, Florianópolis, 2016.

ZANIBONI FILHO, E. Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818). 1992. 202 p. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, 1992.

ZANIBONI FILHO, E; BALDISSEROTTO, B. Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 189-194, jan./mar. 2015.