

Comparação de dois modelos estatísticos visando a otimização da proporção de espermatozóides por ovócito da piabanha

Eduardo Shimoda

UCAM-Campos-RJ, Facastelo-ES
Rua Anita Peçanha, 100 – Campos dos Goytacazes – RJ
shimoda@ucam-campos.br

Dalcio Ricardo de Andrade

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Av. Alberto Lamego, 2000 - Campos dos Goytacazes - RJ
dalcio@uenf.br

Manuel Vazquez Vidal Júnior

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Av. Alberto Lamego, 2000 - Campos dos Goytacazes - RJ
mvidal@uenf.br

George Shigueki Yasui

Hokkaido University
Laboratory of Marine Life Sciences – Japão – 2007
george@fish.hokudai.ac.jp

RESUMO

Com objetivo de determinar a proporção ótima de espermatozóides (sptz) por ovócito na piabanha, dois modelos estatísticos (regressões quadrática e *linear response plateau* – LRP) foram utilizados, sendo os valores ótimos estimados a partir de três conjuntos de dados: (i) apenas dados experimentais (DE), de 86.662 a 433.310 sptz/ovócito; (ii) DE + origem (0 sptz e 0% de fertilização) e; (iii) DE + origem + controle (17.389.444 sptz/ovócito). Os parâmetros estatísticos utilizados para avaliação dos modelos foram: coerência biológica (fertilização em %), significância do quadrado médio do resíduo da regressão (P) e coeficiente de determinação (R^2). O modelo quadrático aplicado aos dados experimentais + origem foi o que apresentou melhores resultados dos parâmetros (fertilização = 94,2%; $P=0,0015$, $R^2 = 98,7\%$), sendo a razão de 426.540 sptz/ovócito considerada como a ótima.

PALAVRAS CHAVE. otimização, estatística, piscicultura.

Área principal: Aplicações Agropecuárias e Meio Ambiente

ABSTRACT

In order to determine the optimal ratio of sperm (sptz) per oocyte in piabanha fish, two statistical models (regression quadratic and linear response plateau - LRP) were used, and the great values estimated from three sets of data: (i) only experimental data (DE), 86,662 to 433,310 sptz/oocyte, (ii) DE + origin (0 sptz/oocyte and 0% of fertilization) and, (iii) DE + origin + control (17,389,444 sptz/oocyte). The parameters used for statistical evaluation of the models were: consistency biological (% of fertilization), medium square significance of regression residue (P) and determination coefficient (R^2). The quadratic model applied to the experimental

data + origin was the best results showed that the parameters (fertilization = 94.2%, $P = 0.0015$, $R^2 = 98.7\%$), and the rate of 426,540 spz/oocyte considered as optimum.

KEYWORDS. optimization, statistics, fish farming..

Main area: Applications Agricultural and Environment.

1. Introdução

A criação de peixes e de outros organismos aquáticos constitui a única solução em potencial capaz de proporcionar o atendimento da crescente demanda mundial por carne de pescado. Segundo estatísticas da FAO (2006), a produção de carne de peixe oriunda da pesca extrativista está praticamente estagnada, apresentando redução de 1,9% no período compreendido entre 2000 a 2005. Em contraste, a aqüicultura apresentou, no mesmo período, crescimento de 34,6%. Neste contexto, o Brasil aparece como forte candidato para ocupar papel de destaque na piscicultura, devido suas condições climáticas favoráveis e seus abundantes recursos hídricos. Embora ainda apresente produção incipiente frente a sua potencialidade, o país tem mostrado rápido crescimento. Dentre os países do mundo com produção superior a 100 mil toneladas/ano, o Brasil foi o que apresentou o maior incremento na produção total de peixes oriundos de criação (águas marinhas e continentais), tendo aumentado em 18,1% sua produção entre os anos de 2000 a 2002 (FAO, 2004). Em adição, dados do IBAMA (2003) revelam que, considerando-se apenas a produção oriunda da criação em águas continentais, entre 1996 e 2001, o aumento foi 200%.

Dentre as diversas espécies nativas do Brasil, a piabanha *Brycon insignis* têm despertado especial atenção por ser muito esportiva na pesca, cujo interesse aumentou após a multiplicação de pesque-pagues (HILSDORF; PETRERE JÚNIOR, 2002), e pelo fato de ser considerada pelo IBAMA como espécie em extinção (BRASIL, 2004). A despeito deste último fato, planos de recuperação da população da espécie têm sido implantados nos últimos anos, incluindo o desenvolvimento de estudos a respeito da produção de alevinos para repovoamento (ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 2001a,b; SOUZA, 2004). Para tal, procede-se a indução da reprodução, realizada em laboratório, sendo os peixes submetidos a aplicação de hormônios que promovem a desova. Os ovos, após a fecundação, são acondicionados em incubadoras até que sejam transferidas para os tanques externos. Este procedimento, descrito por Woynarovich e Horvath (1983), tem sido usado rotineiramente com relativo sucesso. Entretanto, estima-se que a quantidade de sêmen utilizado para fertilizar os ovócitos seja excessiva. Com o intuito de evitar este eventual desperdício, foi desenvolvido um teste de fertilização.

O teste de fertilização constitui o método que melhor permite avaliar a qualidade seminal (RIBEIRO, 2001), sendo seu resultado expresso em percentagem de ovos que atingem a fase de fechamento do blastóporo. Embora os testes de fertilização tenham sido utilizados com frequência em experimentos de criopreservação de sêmen (SILVEIRA *et al.*, 1984 e 1990; KAVAMOTO *et al.*, 1989; CÓSER *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2000), poucos são os trabalhos no Brasil que determinam a razão ótima de espermatozóides por ovócitos.

Em truta *Oncorhynchus mykiss*, foi verificada correlação positiva entre percentagem de fertilização e a motilidade quando foram usadas proporções menores que 200.000 espermatozóides por ovócito (MOCCIA; MUNKITTRICK, 1987). Esta proporção foi encontrada como a ideal na *O. mykiss*, sendo verificados percentuais de fertilização de 80,83% e 80,42% em trabalhos realizados por Billard *et al.* (1974) e Silveira *et al.* (1988), respectivamente. Por outro lado, os resultados podem ser contrastantes, considerando a mesma espécie. Silveira *et al.* (1984) obtiveram, como maior média, 78% de fertilização utilizando 13 milhões de espermatozóides por óvulo da *O. mykiss*.

Suquet *et al.* (1995) realizaram experimento com a espécie marinha *Scophthalmus maximus*, verificando os percentuais de fertilização utilizando diversas proporções espermatozóides/ovócitos e ovócitos em estádios diferentes de maturação. Utilizando ovócitos maduros (estádio 3), obtiveram percentagens de fertilização variando entre 58,4% a 93,9% na proporção de 6000 espermatozóides/ovócito. Em proporções menores, o percentual de fertilização decresceu e o coeficiente de variação aumentou nos tratamentos. Em ovócitos em estágio 4, a variação na percentagem de fertilização foi muito alta, independente da proporção espermatozóides/ovócito.

A razão ótima de espermatozóides por ovócito foi determinada, mediante utilização de equação de regressão quadrática, em outras espécies como a *Thymallus thymallus* (LAHNSTEINER, 2000), *Esox lucius* (MARCEL, 1981), *Coregonus lavarelus*

(LAHNSTEINER, 2000), *Hippoglossus hippoglossus* (SUQUET *et al.*, 1995), *Cyprinus carpio* (MARCEL, 1981) e *Scophthalmus maximus* (SUQUET *et al.*, 1995), sendo obtidos resultados que variaram de 6.000 (*T. thymallus*) a 1.600.000 (*S. maximus*). Por outro lado, Shimoda *et al.* (2007) e Bombardelli *et al.* (2006) estimaram a proporção ótima de espermatozóides / ovócito a partir do modelo de regressão *linear response plateau*.

A obtenção da quantidade de espermatozóides para fertilizar uma determinada massa de ovócitos é importante na rotina de reprodução artificial, permitindo a otimização do sêmen, reduzindo o número de reprodutores e a área e gastos demandados para manutenção destes. Em adição, seria evitada a utilização de menos sêmen do que o necessário, o que poderia implicar em menores percentuais de fertilização. Isto posto, o objetivo deste trabalho foi determinar a razão ótima de espermatozóides por ovócito de piabanha *B. insignis*.

2. Material e métodos

Foram selecionados exemplares de piabanha *Brycon insignis* de ambos os sexos, presentes na estação experimental do Projeto Piabanha, em Itaocara (RJ), e que se apresentaram no estágio de maturação gonadal avançada, sendo escolhidas as fêmeas que apresentaram abdômen abaulado e papila genital avermelhada, e os machos que apresentaram saída de sêmen mediante massagem abdominal no sentido antero-posterior. Estes exemplares foram transportados ao laboratório e submetidos ao procedimento de hipofiseação proposto por Woynarovich e Horvath (1985). As fêmeas receberam a dosagem preparatória de 0,5 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHc) por quilograma de peso vivo. Decorridas 12 horas, foram aplicadas a dosagem final de 5,0 mg EBHc/Kg peso vivo, nas fêmeas, e a dosagem única de 0,5 mg EBHc/kg peso vivo, nos machos.

Após 200 horas-grau, procedeu-se a extrusão, primeiramente dos machos, sendo coletados 5mL de sêmen de cada macho em tubos de vácuo de 10 mL, após secagem da papila genital e das áreas adjacentes. Logo após a coleta, seguiram-se a adição de duas gotas de solução de NaHCO₃ 1% a 1 gota de sêmen e a verificação da motilidade espermática subjetiva (BILLARD; COSSON, 1992). As duas amostras apresentaram mais do que 90% de motilidade. Posteriormente, as amostras seminais foram misturadas para constituição de um pool, cuja motilidade observada foi de 90%, a partir da qual retirou-se três alíquotas para determinação da concentração espermática. Procedeu-se, então, a pré-diluição da amostra, misturando-se 1 mL do sêmen com 9 mL de solução não ativadora, de NaCl 1,2% (pré-diluição = 10 vezes). Esta solução foi diluída novamente, nas proporções de volume de sêmen pré-diluído/volume de NaCl 1,2%: 1) 200µL/3800µL (diluição total = 200 vezes); 2) 400µL/ 3600µL (diluição total = 100 vezes); 3) 600µL/3400µL (diluição total = 66,7 vezes); 4) 800µL/3200µL (diluição total = 50 vezes); 5) 1000µL/3000µL (diluição total = 40 vezes).

Realizou-se, então, a extrusão das fêmeas. Ambas se mostraram preparadas fisiologicamente para a desova, haja vista a facilidade para a extrusão dos ovócitos. Papila genital e regiões adjacentes (abdômen e nadadeira anal) foram secas, sendo a desova coletada em bacias plásticas secas, uma para cada fêmea. A seguir misturaram-se as desovas para constituição de um pool, do qual retiraram-se três sub-amostras, com 1 g cada, sendo estas amostras acondicionadas em tubos de vácuo de 10 mL, contendo formol, para contagem do número de ovócitos, realizada após 2 horas.

A partir da amostra composta inicial, foram retiradas também amostras contendo 2,0g cada, e estas colocadas em copos plásticos de 300 mL numerados de acordo com o tratamento utilizado. Para estabelecimento dos tratamentos, em cada copo plástico, foi utilizado 1mL de uma das diluições, sendo que cada tratamento teve três repetições. Ato imediato ao acréscimo do sêmen diluído, foram adicionados a cada copo plástico 2 mL de NaHCO₃ 1% para ativação dos espermatozóides.

As diluições a partir do sêmen a fresco foram consideradas em concentrações de 24,3 x 10⁹ espermatozóides/mL e adicionados 1 mL de sêmen diluído nos 2g de ovócitos (701 ovócitos/g), obteve-se as seguintes proporções de espermatozóides por ovócitos utilizadas em

cada tratamento: T1) 86.662; T2) 173.324; T3) 259.986; T4) 346.648; T5) 433.310.

Após a mistura do sêmen de cada tratamento com os ovócitos, para a fecundação, os ovos foram hidratados por 20 min, utilizando-se água destilada, após o que foram transferidos para as incubadoras. Cada repetição foi colocada em uma incubadora, constituída por uma garrafa transparente Pet de 2 L invertida, com tela para evitar a saída dos ovos. A entrada da água ocorreu pela parte inferior da garrafa invertida, ficando os ovos oxigenados e em suspensão durante seu desenvolvimento.

Os ovos permaneceram na incubadora na qual foi acompanhado o desenvolvimento embrionário, sendo que, nas primeiras 8 horas, foi realizada amostragem a cada 2 horas e, posteriormente, a cada 30 minutos. Os primeiros ovócitos com fechamento de bastóporo foram observados após 8,5 horas de incubação. Decorridas mais de 1,5 hora, ou seja, 10 horas depois da colocação dos ovos na incubadora, foi verificada a percentagem ovos fertilizados.

Os dados de fertilização em função da proporção sptz/ovócito foram submetidos à análise de variância e de regressão linear (regressão quadrática) e não linear (*linear response plateau* – LRP).

O modelo quadrático foi definido pela equação:

$$Y = aX^2 + bX + c$$

Onde Y é a fertilização (% em relação ao controle), X é a proporção sptz/ovócito, “a” é o coeficiente quadrático, “b” é o coeficiente linear, e “c” é a constante. A obtenção dos coeficientes foi obtida aplicando-se o método de mínimos quadrados.

O modelo de regressão *linear response plateau* foi definido pelas equações:

$$Y = aX + b, \text{ se } X < C$$

$$Y = F, \text{ se } X \geq C$$

Onde Y e X são definidos anteriormente, “a” é o coeficiente linear, “b” é o intercepto, a constante C é o ponto de interseção do modelo linear com o plateau, “F” é a fertilização (% em relação ao controle) quando se atinge o plateau. O modelo foi submetido, para estimativa dos parâmetros, à metodologia iterativa de Gauss-Newton.

Os dois modelos foram aplicados a diferentes conjuntos de dados:

- (i) apenas dados experimentais (DE), de 86.662 a 433.310 sptz/ovócito;
- (ii) DE + origem (0 sptz e 0% de fertilização) e;
- (iii) DE + origem + controle (17.389.444 sptz/ovócito)

O ponto ótimo (sptz/ovócito) nas equações do modelo quadrático foram estimados igualando-se a derivada primeira da equação a zero. No modelo LRP, foi considerado como ponto ótimo aquele correspondente ao interseção do modelo linear com o plateau.

Os dois modelos de regressão (quadrática e LRP) aplicados aos 3 conjuntos de dados foram comparados adotando-se como critérios para escolha do melhor ponto ótimo: coerência biológica (% de fertilização), significância do quadrado médio do resíduo da regressão (P) e valor do coeficiente de determinação (R^2).

3. Resultados e Discussão

As médias das taxas de fertilização dos ovos de piabanha, em função das diferentes proporções de espermatozoides por ovócito utilizadas, podem ser observadas na Tabela 1.

As taxas médias de fertilização aumentam gradativamente até a proporção de 346.648 espermatozoides por ovócitos. Quando a proporção é aumentada para 433.310, a percentagem de ovócitos fertilizados permanece praticamente a mesma. A tendência de estabilização fica mais nítida se for verificada a média de fertilização do controle, em que foi usado 1 mL de sêmen sem diluição. As taxas médias de fertilização na proporção de 433.310 espermatozoides por ovócito foram próximas das obtidas no tratamento controle, constituído de sêmen não diluído.

Tabela 1- Taxa de fertilização (%) ajustada em relação ao controle (média observada = 65,3%) da piabanha *Brycon insignis* (n=3) verificadas em diferentes proporções de espermatozoides (sptz) por ovócito

TRATAMENTOS	PROPORÇÃO SPTZ / OVÓCITOS	TAXA DE FERTILIZAÇÃO (%) EM RELAÇÃO AO CONTROLE	
		MÉDIAS ± DESVIO-PADRÃO	CV (%)
T1	86.662	35,7 ± 18,1	50,7
T2	173.324	53,1 ± 36,3	68,4
T3	259.986	79,1 ± 21,5	27,2
T4	346.648	93,4 ± 32,7	35,0
T5	433.310	87,8 ± 24,3	27,7
CONTROLE	17.389.444	100,0 ± 26,7	26,7

CV = coeficiente de variação; T1 = tratamento 1; T2 = tratamento 2; T3 = tratamento 3; T4 = tratamento 4; T5 = tratamento 5.

A tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros estatísticos de acordo com o modelo e dos conjuntos de dados utilizados.

Tabela 2- Equações de regressão, significância do quadrado médio do resíduo da regressão (P), coeficiente de determinação (R^2) e ponto ótimo (sptz/ovócito; % fertilização) nos dois modelos (quadrático e LRP) e aplicados aos três conjuntos de dados

MODELO	EQUAÇÃO	P	R^2	PONTO ÓTIMO
Q1	$\hat{Y} = -0,000549X^2 + 0,452X - 2,38$	0,0346	96,5%	(411.907; 95,5)
LRP1	$\hat{Y} = 0,230X + 15,6$	0,0058	98,9%	(314.482; 87,8)
Q2	$\hat{Y} = -0,000520X^2 + 0,4436X - 0,425$	0,0015	98,7%	(426.540; 94,2)
LRP2	$\hat{Y} = 0,294X + 3,77$	0,0091	98,2%	(295.440; 90,6)
Q3	$\hat{Y} = -0,0000121X^2 + 0,216X - 12,2$	0,0062	92,1%	(8.925.620; 951,8)
LRP3	$\hat{Y} = 0,294X + 3,77$	0,0091	98,2%	(306.101; 93,7)

\hat{Y} = fertilização (%) estimada

X = espermatozoides x 1000 / ovócito

Q1: quadrática, apenas pontos experimentais;

LRP1: *linear response plateau*, apenas pontos experimentais;

Q2: quadrática, pontos experimentais e origem (0);

LRP2: *linear response plateau*, pontos experimentais e origem (0);

Q3: quadrática, pontos experimentais, origem e controle;

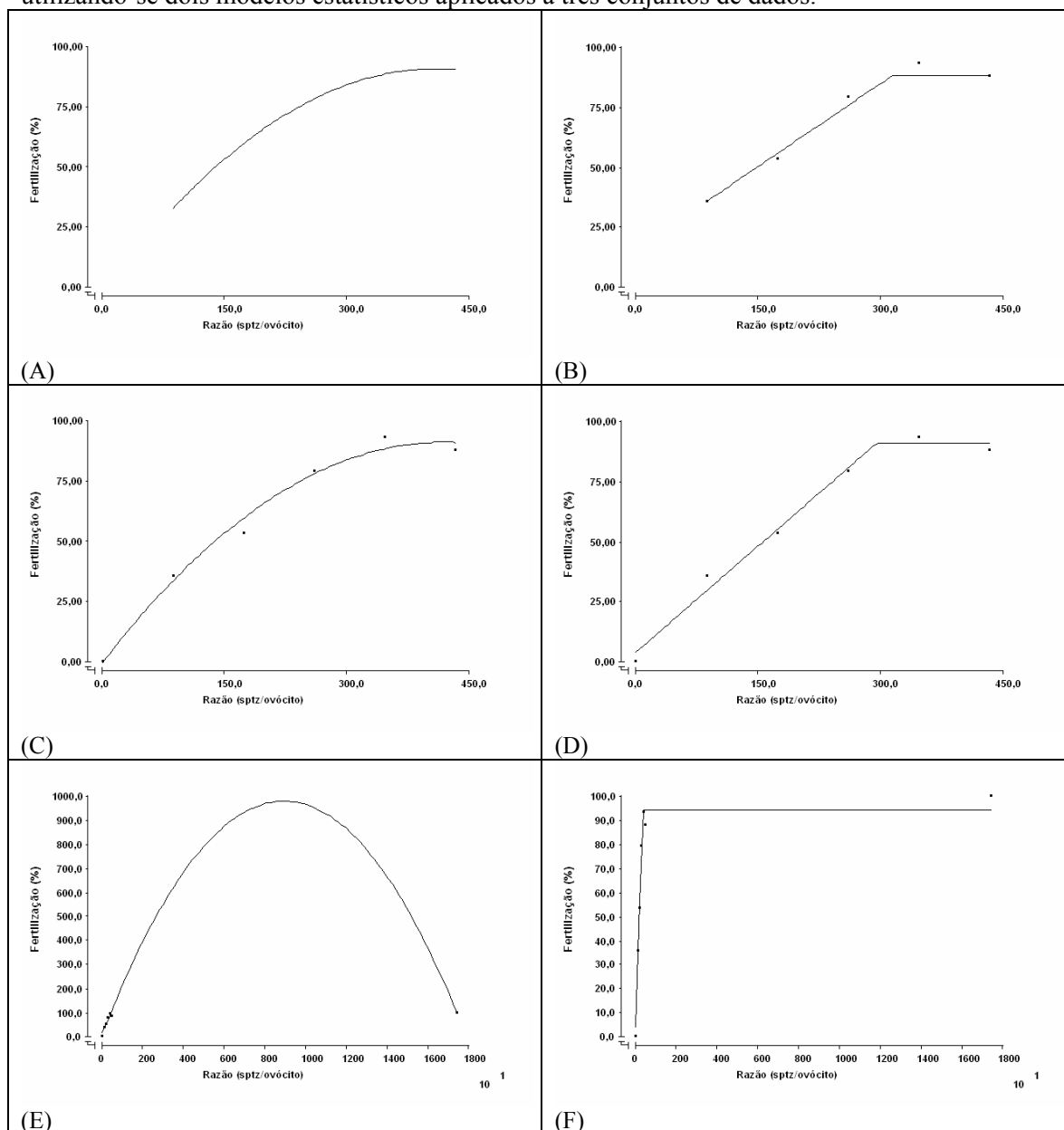
LRP3: *linear response plateau*, pontos experimentais, origem (0) e controle.

Analisando-se os resultados obtidos, sob o ponto de vista biológico, percebe-se que o modelo quadrático aplicado aos pontos experimentais, origem e controle, foi o único que não apresentou coerência, uma vez que o ponto de máxima correspondeu a uma fertilização de 951,8% dos ovócitos. Este resultado, bem como os demais, podem também ser observados graficamente na Figura 1. Por outro lado, a regressão que apresentou maior fertilização estimada foi a correspondente a Q1 (quadrática, apenas com os pontos experimentais). Esta, entretanto, foi a que demonstrou pior significância do quadrado médio do resíduo da regressão ($P=0,0346$)

O modelo LRP aplicado apenas aos dados (LRP1) foi o que apresentou maior coeficiente de determinação ($R^2 = 98,9$), embora a fertilização máxima estimada tenha sido a menor (87,8% de fertilização).

Dentre todas as equações apresentadas, a que apresentou, de forma geral, melhor índices dos parâmetros foi a do modelo quadrático aplicado aos dados experimentais e à origem (Q2). Além da significância ter sido a melhor ($P=0,0015$), foi uma das que apresentou maior fertilização (94,2%) e alto coeficiente de determinação ($R^2 = 98,7\%$). Neste modelo, com este conjunto de dados, a proporção ideal foi de 426.540 espermatozoides/ovócito.

Figura 1- Fertilização (em %) em função da razão espermatozóides por ovócito de piabanha, utilizando-se dois modelos estatísticos aplicados a três conjuntos de dados.



- (A) quadrática, apenas pontos experimentais;
- (B) *linear response plateau*, apenas pontos experimentais;
- (C) quadrática, pontos experimentais e origem (0);
- (D) *linear response plateau*, pontos experimentais e origem (0);
- (E) quadrática, pontos experimentais, origem e controle;
- (F) *linear response plateau*, pontos experimentais, origem (0) e controle.

Ainda, a respeito da coerência biológica do ponto ótimo, Lahnsteiner (2000) afirma que a proporção ideal de espermatozóides por ovócito depende do diâmetro dos ovócitos. Espermatozóides de peixes fertilizam os ovócitos entrando por uma abertura denominada micrópila. Segundo Suquet *et al.* (1995), quanto menor o diâmetro do ovócito, maior a probabilidade dos espermatozóides alcançarem o aparato micropilar e fecundá-lo. Vazzoler (1996) descreve que a quantidade de ovócitos por grama tem inversa correlação com o tamanho

destes gametas. Assim, quanto menores os ovócitos, maior a quantidade de ovócitos por grama e menor o seu diâmetro. No presente trabalho, o indicador do tamanho dos ovócitos foi a quantidade de ovócitos por grama. Embora o diâmetro ovocitário da piabanha não tenha sido medido no experimento, Souza (2004) verificou que o mesmo, em situações experimentais semelhantes, mede 1,3mm.

A razão ideal de aproximadamente 426×10^3 espermatozóides por ovócito obtida na piabanha, considerando que 1 g (~ 1 mL) de ova apresentou cerca de 700 ovócitos, é compatível com a tendência exibida na Tabela 2, que demonstra que ovócitos maiores necessitam de mais espermatozóides para fecundação.

As espécies *T. thymallus* (LAHNSTEINER, 2000), *E. lucius* (MARCEL, 1981), *C. lavaretus* (LAHNSTEINER, 2000), *H. hippoglossus* (SUQUET *et al.*, 1995) apresentam ovócitos maiores do que as da piabanha e, provavelmente por isso, necessitam de mais células espermáticas para fecundar ovócitos. De forma análoga, as menores razões ótimas espermatozóides/ovócito verificadas no *S. maximus* (SUQUET *et al.*, 1995) e no *C. carpio* (Marcel, 1981) podem ser explicadas pelo fato de seus ovócitos serem menores do que os encontrados na piabanha. Por outro lado, a mesma relação não foi verificada na truta *O. mykiss* que, apesar de apresentar ovócitos de maior diâmetro, mostrou proporção ótima espermatozóides/ovócito menor que a piabanha. Segundo Suquet *et al.* (1995), a distância que pode ser percorrida pelo espermatozóide, que depende da velocidade espermática e tempo de motilidade, influencia na capacidade fecundante. Assim, é possível que o espermatozóide de truta tenha movimento mais rápido e duradouro, sendo necessária menor quantidade para fecundar um ovócito.

Tabela 2 - Razão ótima de espermatozóides por ovócito de acordo com o tamanho dos ovócitos em algumas espécies. Espécies de peixe com ovócitos maiores do que a da piabanha são citadas acima desta e as com ovócitos menores, abaixo

Espécie	Indicativo do tamanho do ovócitos (ovócitos/mL ou diâmetro do ovócito)	Razão ideal sptz x 10³/ovócito	Autor
<i>Thymallus thymallus</i>	40 ovócitos/mL	1200 – 1600	LAHNSTEINER (2000)
<i>Esox lucius</i>	Diâmetro = 2 mm	700	MARCEL (1981)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Diâmetro = 4 mm	200	SILVEIRA <i>et al.</i> (1988)
		300	BILLARD (1975)
<i>Coregonus lavaretus</i>	150 ovócitos/mL	300 – 500	LAHNSTEINER (2000)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Diâmetro = 3 mm	1600	SUQUET <i>et al.</i> (1995)
<i>Brycon insignis</i>	701 ovócitos/g Diâmetro = 1,3 mm	426	Presente trabalho SOUZA (2004)
<i>Cyprinus carpio</i>	1500 ovócitos/g	13	MARCEL (1981)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Diâmetro = 1 mm	6	SUQUET <i>et al.</i> (1995)

Considerando-se que, em média, a concentração do sêmen da piabanha é de aproximadamente 25×10^9 espermatozóides/mL e que cada 1 g de desova apresenta cerca de 700 ovócitos, recomenda-se, na rotina de desova induzida da piabanha, a utilização de pelo menos 1,3mL de sêmen para cada 100g de ovócitos.

4. Conclusão

O modelo estatístico que melhor estimou a proporção ótima espermatozoides/ovócito foi o quadrático aplicado aos dados experimentais e considerando-se o ponto de origem (0 espermatozoides e 0% de fertilização), sendo recomendável a utilização de pelo menos 426 mil espermatozoides por ovócito para obtenção de até 97,8% de fecundação em relação ao controle.

Referências

- Andrade-Talmelli, E.F.; Kavamoto, E.T.; Fenerich-Verani, N (2001). Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, p. 149 – 154.
- Andrade-Talmelli, E.F.; Kavamoto, E.T., Romagosa, E. et al (2001). Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca*, v. 27, p.21 – 28.
- Bombardelli, R.A., Morschbacher, E.F., Campagnolo, R. et al (2006). Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *R. Bras. Zootec.*, vol. 35, no. 4. 1251-1257.
- Billard, R. (1975). L’insemination artificielle de la truite, *Salmo gairdneri* Richardson. V. Effets de la dilution et définition du rapport optimum gamètes/dilueur. *Bull. Fr. Piscicult.*, v. 257, p. 121-135.
- Billard, R.; Petit, J.; Jalabert, B. et al. Artificial insemination in trout using a sperm dilluent. In:J.H.S. Blaxter (editor), The early life history of fish. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 715-723. 1974 .
- BRASIL (2004). Instrução Normativa nº 05/04 – Reconhecimento como espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexploradas (invertebrados aquáticos e peixes) – *Diário Oficial da União*, Brasília, 21 Mai.
- Cóser, A.M.L.; Godinho, H.P.; Sato, Y. (2000) Capacidade de fertilização do sêmen de *Prochilodus marginatus* (curimatá-pacu) congelados sob forma de "pellets". In: Encontro Anual de Aqüicultura, Belo Horizonte, 10º. *Resumos...* Belo Horizonte, p. 56-59.
- FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma: FAO Fisheries Department, 2006. 198 p.
- FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma: FAO Fisheries Department, 2004. 150 p.
- Fauvel, C.; Savoye, O.; Dreanno, C. et al. (1999). Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J. Fish Biol.*, v. 54, p. 356-369.
- Hilsdorf, A.W.S.; Petrere Jr., M. (2002). Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje*, v.30, n.180, p. 62-65.
- IBAMA. *Estatística da pesca - 2001*: Brasil - Grandes regiões e unidades da federação. Tamandaré (pe): Mma, 2003. 124 p.
- Kavamoto, E.T.; Silveira, W.F.; Godinho, H.M. et al. (1989) Conservação em nitrogênio líquido do sêmen de *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881. *Bol. Inst. Pesca*, v. 16, p. 29-36.
- Kavamoto, E.T.; Silveira, W.F.; Rigolino, M.G.; et al. (1987) Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. *Bol. Inst. Pesca*, v. 14, p. 51-62.
- Lahnsteiner, F. (2000) Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. *Aquac. Res.*, v. 31, p. 245-258.
- Marcel, J. *Contrôle de la reproduction et gestions des gamètes de quelques espèces de poissons téléostéens*. Diplôme de l’Ecole Pratique des hautes Etudes. Lyons. 1981. 132 p.
- Moccia, R.D., Munkittrick, K.R. (1987) Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and motility of spermatozoa. *Theriogenology*, v. 27, p. 679-688.
- Nomura, H. *Dicionário dos Peixes do Brasil*. Editerra. Brasília. 1984. 482p.
- Ribeiro, R.I.M.A. *Criopreservação do sêmen do piau-açu Leporinus macrocephalus (Garavello e Britski, 1998)*. 2001. 65f. Dissertação. Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Silva, E.B. *Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836)*. 2000. 49f. Dissertação. Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Silveira, W.F.; Kavamoto, E.T.; Rigolino, M.G. et al. (1988) Fertilidade do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 15, p. 51-57.
- Silveira, W.F.; Kavamoto, E.T.; Cestarolli, M.A. et al. (1990). Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Bol. Inst. Pesca*, v. 17, p. 1-13.
- Silveira, W.F.; Kavamoto, E.T.; Rigolino, M.G. et al. (1984). Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, v. 11, p. 131-136.

- Souza, G. *Indução à desova, ontogenia inicial, etologia larval e alevinagem da piabanha (Brycon insignis Steindachner, 1877)*. 2004. 73f. Dissertação. Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.
- Suquet, M.; Billard, R.; Cosson, J. *et al.* (1995). Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture*, v. 133, p. 83-90.
- Suquet, M.; Dreanno, C.; Fauvel, C. *et al.* (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, v. 31, p. 231-243.
- Vazzoler, A. E. A. de M. *Biologia e reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Eduem. Maringá. 1996. 169p.
- Woynarovich, E., Horvath, L. *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. FAO/CODEVASF/CNPq. Brasília. 1983. 200 p.