

Capacidade fecundante do sêmen congelado de *Prochilodus brevis*

Fertilizing Capacity of the Cryopreserved Sperm of *Prochilodus brevis*

Larissa Teixeira Nunes, Mayara Setúbal Oliveira-Araújo, Júlia Trugilio Lopes, Priscila Silva de Almeida-Monteiro, Renata Vieira do Nascimento, Vanessa Alves Pereira, Yasmim Maia Ferreira, Assis Rubens Montenegro, Jéssica Uchôa Pinheiro & Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley

ABSTRACT

Background: Seminal cryopreservation is a technique that optimizes aquacultural production, as it requires less breeding and enables reproduction outside of the breeding season. This technique also helps to preserve species, thus reducing the pressure on the natural stocks. Several studies have sought to develop freezing protocols that result in semen of a good quality. However, some studies do not evaluate the ability of frozen semen to produce viable larvae. Therefore, the aim of this study was to verify the fertilizing capacity of the frozen semen of *Prochilodus brevis*.

Materials, Methods & Results: Semen from twenty adult males of the Brazilian bocachico was collected and evaluated to establish the total motility, curvilinear velocity, straight linear velocity, average path velocity, membrane integrity, pH, and concentration. Six pools were formed, each of which was diluted in a freezing medium containing 5% glucose with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) or 5% glucose with 10% methyl glycol (MG). The samples were loaded into 0.25 mL French straws, frozen in a dry shipper, and stored in a liquid nitrogen canister. The semen was then thawed and evaluated to establish the total motility, curvilinear velocity, straight linear velocity, average path velocity, and membrane integrity. For the fertilization test, four females were used. The oocytes from each female were divided into three batches and fertilized with either fresh or cryopreserved semen. The rates of fertilization, hatching, and larval survival were then measured. Data were expressed as the mean \pm standard deviation and analyzed using SAS (2002). The frozen semen with glucose + DMSO was significantly higher ($P < 0.001$) than the frozen semen with glucose + MG, in all seminal quality parameters evaluated ($63.95 \pm 15.88\%$ and $25.36 \pm 3.53\%$ for the motility, $36.38 \pm 7.02 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ and $20.45 \pm 2.84 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for the curvilinear velocity, $19.26 \pm 2.74 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ and $3.03 \pm 1.40 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for the straight linear velocity, $25.70 \pm 6.51 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ and $6.90 \pm 1.12 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for the average path velocity, and $63.58 \pm 6.95\%$ and $35.58 \pm 11.26\%$ for the membrane integrity, respectively). MG were very close to zero and not statistically significant. Regarding these same parameters, there were no significant differences ($P > 0.05$) when the fresh semen was compared to the cryopreserved semen with glucose + DMSO ($36.25 \pm 2.5\%$ and $29.16 \pm 5.64\%$ for the fertilization rate, $38.56 \pm 11.23\%$ and $29.33 \pm 11.75\%$ for the hatching rate, and $11.59 \pm 5.16\%$ and $7.63 \pm 5.46\%$ for the larval survival rate, respectively).

Discussion: This is the first study of the artificial fertilization of *Prochilodus brevis* using cryopreserved semen. Seminal quality parameters are important for predicting the success of the cryopreservation technique, however, *in vivo* tests are essential to confirm such success. Thus, obtaining larvae is a major step towards the standardization of a cryopreservation protocol for a particular species. It is known that cryopreservation reduces the seminal quality but is a necessary process for the conservation of male gametes in the long term and, as shown in this study, good results can be obtained. In this study, the best results were obtained with the inclusion of DMSO in the freezing medium. This effect can be attributed to DMSO having a very low molecular weight, which decreases the formation of ice crystals. Considering the results obtained, we concluded that it is feasible to obtain larvae of the Brazilian bocachico using frozen semen in a 5% glucose solution with 10% DMSO.

Keywords: seminal freezing, fish, fertilization, brazilian bocachico.

Descritores: congelamento seminal, peixe, fertilização, curimatã comum.

DOI: 10.22456/1679-9216.92791

Received: 21 January 2019

Accepted: 15 May 2019

Published: 16 June 2019

Article based on a Dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. CORRESPONDENCE: L.T. Nunes [larissatn.br@hotmail.com - Tel.: +55 (85) 3101-9860]. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UECE, Campus do Itaperi. Av. Dr. Silas Munguba n. 1700. CEP 60714-903 Fortaleza, CE, Brazil.

INTRODUÇÃO

O *Prochilodus brevis*, conhecido popularmente como curimatã comum, é um peixe migratório, endêmico dos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. Sua importância ecológica está relacionada principalmente ao regime alimentar detritívoro, quando adulto, realizando a ciclagem dos nutrientes no ecossistema fluvial [16]. Essa espécie também apresenta potencial econômico, com a apreciação de sua ova e importância social, uma vez que seu consumo também está ligado à subsistência [10]. Entretanto, fatores como construção de barragens, pesca predatória, escassez de chuvas e poluição têm afetado sua sobrevivência [9].

Uma alternativa para contornar os problemas supracitados é a congelamento seminal. Essa técnica assegura o armazenamento do material genético, contribuindo para a conservação da biodiversidade e otimiza a reprodução assistida, com o uso de menos reprodutores e disponibilização dos gametas o durante o ano todo [8].

Aspectos importantes para a congelamento do sêmen de *P. brevis* já foram verificados, como taxa de diluição, meios de congelamento e temperatura e tempo de descongelamento [6,12]. No entanto, não há relatos sobre ensaios de fertilização com sêmen descongelado, que são indispensáveis para a comprovação do sucesso dessa técnica. Sabe-se que há uma perda da qualidade do sêmen descongelado [5], mas é necessário averiguar em termos quantitativos e qualitativos o quanto esse sêmen ainda pode fertilizar ovócitos. Portanto, baseado nas informações já disponíveis na literatura, este trabalho teve como objetivo verificar a capacidade fecundante do sêmen de *Prochilodus brevis* submetido ao processo de congelamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manipulação dos animais e coleta seminal

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil. Vinte machos de curimatã comum, que apresentavam papila urogenital hiperêmica e liberação de sêmen sob leve massagem abdominal, foram selecionados e induzidos hormonalmente à reprodução com duas doses de extrato hipofisário de carpa (EHC; 0,3 mg.kg⁻¹ e 3 mg.kg⁻¹ de peso vivo) aplicadas com 12 h de intervalo por via intracelomática

Decorridas oito horas da indução hormonal, os animais foram sedados em solução de Eugenol (Sigma-Aldrich®)¹, na proporção de 1:10:10000 (Eugenol:álcool:água) para facilitar a contenção e minimizar o estresse. Em seguida, o sêmen foi coletado em seringas estéreis por meio de leve massagem abdominal e mantido em caixa térmica até o processamento das amostras. Foram confeccionados 6 *pools* de sêmen a partir das amostras aptas à congelamento, aquelas que apresentavam motilidade superior a 85% após ativação.

Análise da concentração espermática

Uma alíquota de 2 µL de sêmen de cada *pool* foi fixada em solução de citrato formolizada a 4% na proporção de 1:4000 (sêmen:solução fixadora). A concentração espermática foi calculada por meio de contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz (400x).

Análise da cinética espermática

O sêmen foi avaliado quanto à motilidade total (%), velocidade curvilinear (VCL - µm.s⁻¹), velocidade em linha reta (VSL - µm.s⁻¹) e velocidade média do percurso (VAP - µm.s⁻¹) em sistema de análise seminal auxiliada por computador (CASA), utilizando o *software Sperm Class Analyser* (SCA, Microptics® - versão 3.2)². Para isso, 1 µL de sêmen foi depositado em câmara de Makler, homogeneizado em 100 µL de solução ativadora (NaCl 125 mM) e submetido imediatamente às análises.

Análise da integridade de membrana espermática

Para essa análise, o sêmen foi corado pelo método de eosina-nigrosina na proporção 1:2:2 (sêmen:eosina:nigrosina). Foram confeccionados esfregaços (uma lâmina/*pool*) com uma alíquota de 10 µL de sêmen corado e a leitura das lâminas (200 espermatozoides por lâmina) foi realizada em microscópio de luz (400x). Os espermatozoides foram considerados com membrana íntegra, quando permaneciam incolores, ou com membrana rompida, quando corados de rosa ou vermelho.

Congelamento e descongelamento seminal

Cada *pool* foi diluído em meio de congelamento contendo 5% de glicose (Vetec®)³ + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®)⁴ na proporção 1: 9 (sêmen: meio de congelamento) [12] ou 5% de glicose + 10% de metilglicol (MG) (Dinâmica®)⁴ na proporção 1: 6 (sêmen: meio de congelamento) [6] e envasado em

palhetas francesas de 0,25 mL (5 replicatas), seladas com álcool polivinílico. Em seguida, as amostras permaneceram por 10 minutos em freezer (-10°C) para tempo de equilíbrio, foram congeladas em *dry shipper* (-170°C) durante 15 min e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Após um ano, o sêmen foi descongelado a 30°C por 16 s (glicose + DMSO) ou a 25°C por 30 s (glicose + MG) e avaliado quanto à motilidade total, VCL, VSL, VAP e integridade de membrana, sendo utilizada a mesma metodologia descrita para o sêmen *in natura*.

Teste de fertilização

Quatro machos (que apresentavam liberação de sêmen sob leve pressão abdominal e papila urogenital hiperêmica) e quatro fêmeas de curimatã comum (que apresentavam abdômen abaulado e papila urogenital hiperêmica), foram selecionados e induzidos à reprodução com EHC. Os machos receberam a mesma dosagem já descrita, enquanto que nas fêmeas foram administradas as doses de 0,5 e 5 mg.kg⁻¹ de peso corporal, com intervalo de 12 h entre as aplicações, por via intracelomática. Após oito h da segunda indução, o sêmen e os ovócitos foram coletados por meio de leve massagem abdominal no sentido craniocaudal e armazenados em tubos graduados e placas de Petri, respectivamente. A concentração de ovócitos foi realizada a partir da contagem de três amostras de 1 g.

Os ovócitos provenientes de cada fêmea foram divididos em três amostras de 2,5 g, uma destinada à fertilização com um *pool* de sêmen *in natura* (controle) e as outras duas à fertilização com sêmen congelado/descongelado (glicose + DMSO ou glicose + MG). A fertilização foi realizada a seco, para isso, os espermatozoides foram cuidadosamente misturados com os ovócitos, numa proporção de $3,6 \cdot 10^5$ espermatozoides para cada ovócito, seguida da adição de 100 mL de água do sistema de cultivo e sutil homogeneização durante um minuto. Após isso, os ovos foram transferidos para incubadoras cilíndricas em sistema com recirculação de água para incubação ($26,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$).

A taxa de fertilização foi determinada oito horas após a fertilização, momento em que os embriões alcançaram a fase de fechamento do blastóporo [2]. Para isso, uma amostra de embriões foi cuidadosamente coletada de cada incubadora com auxílio de peneira, depositada em placa de Petri e a porcentagem de ovos fertilizados foi calculada a partir da observação de 300 embriões em estereomicroscópio. Decorridas

18 h da fertilização, a taxa de eclosão foi determinada em porcentagem observando-se 100 embriões/larvas, considerando como eclodidos aqueles cuja membrana de fecundação apresentava-se rompida. A taxa de sobrevivência larval, realizada 96 h após a eclosão, foi calculada como a razão entre o número de larvas vivas e o número de ovos distribuídos em cada incubadora. A cronologia do desenvolvimento embrionário foi acompanhada e amostras de embriões/larvas foram coletados e fixados em formol a 10% e após 24 h transferidos para álcool a 70%. Foram feitos registros fotográficos em estereomicroscópio.

Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificação da distribuição normal dos resíduos e homocedasticidade, respectivamente. Quando necessário, os dados foram transformados para adequarem-se à análise de variância (ANOVA). Foi realizada a ANOVA utilizando o PROC GLM do programa SAS (2002), considerando um delineamento inteiramente casualizado. As comparações entre as médias foram feitas por meio do teste Student-Newman-Keuls (SNK). O nível de significância considerado foi de 5%. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão das médias.

RESULTADOS

A concentração espermática foi de $30,75 \pm 10,39 \times 10^9$ espermatozoides/mL para o sêmen *in natura*. A média da motilidade total do sêmen *in natura* foi de $99,10 \pm 0,99\%$, VCL de $134,10 \pm 3,96 \mu\text{m.s}^{-1}$, VSL de $67,55 \pm 13,79 \mu\text{m.s}^{-1}$, VAP de $106,80 \pm 18,10 \mu\text{m.s}^{-1}$ e integridade de membrana de $99,9 \pm 0,14\%$. A concentração média de ovócitos foi de 1353,33 ovócitos/g. Para o sêmen descongelado, quando comparados os meios de congelação, observou-se que o meio de congelação contendo glicose + DMSO proporcionou resultados superiores ($P < 0,001$) ao contendo glicose + MG em todos os parâmetros avaliados (Tabela 1).

Os resultados referentes aos parâmetros avaliados após a fertilização são mostrados na Figura 1. Os valores obtidos a partir do sêmen congelado com glicose + MG foram muito próximos a zero e, por isso, não foram estatisticamente considerados. As taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência larval utilizando sêmen *in natura* não diferiram ($P > 0,05$) do sêmen congelado com glicose + DMSO.

Os embriões provenientes tanto da fertilização com sêmen *in natura* quanto do congelado com glicose + DMSO alcançaram os estágios de desenvolvimento embrionário em tempos similares. Durante a embriogênese notou-se que a morfologia dos embriões oriundos do sêmen *in natura* e do descongelado era semelhante. Na Figura 2 podem ser observados embriões em diferentes fases de desenvolvimento e uma larva recém eclodida de *P. brevis* resultantes da fertilização utilizando sêmen congelado com glicose + DMSO. A eclosão ocorreu 900 min após a fertilização.

DISCUSSÃO

No presente estudo realizaram-se pela primeira vez testes de fertilização utilizando sêmen congelado de *P. brevis*, destacando-se resultados promissores. Até o momento haviam sido avaliados os seguintes pontos sobre a qualidade seminal: meios de congelamento, taxa de diluição, tempo de equilíbrio, temperatura e tempo de descongelamento, suplementação do meio de congelamento, tempo e forma de armazenamento até a congelamento [1,6,11,12]. Dessa forma, existia a necessidade de averiguar a capacidade fecundante do sêmen descongelado de *P. brevis*.

O meio de congelamento contendo glicose + DMSO apresentou bons resultados, sendo melhor que o meio composto por glicose + MG para os parâmetros de avaliação *in vitro* (motilidade, VCL, VSL, VAP e integridade de membrana) e equivalente ao sêmen *in natura*, para os parâmetros avaliados no teste *in vivo* (taxas de fertilização eclosão e sobrevivência larval).

Dentre os crioprotetores utilizados na congelamento seminal de diversas espécies brasileiras de água doce, o DMSO mostrou-se efetivo [19]. No entanto, outros estudos demonstraram que melhores resultados de motilidade eram alcançados com o uso de metilglicol [19,20]. Os bons resultados atribuídos ao DMSO podem estar relacionados ao seu baixo peso molecular, alta solubilidade em soluções aquosas e capacidade de

permeabilizar células vivas [7]. Tais propriedades proporcionam um ambiente estável durante a congelamento e descongelamento devido à diminuição da formação de cristais de gelo [18]. O metilglicol também possui baixo peso molecular e possui baixa toxicidade [15]. A baixa capacidade protetiva do metilglicol pode estar relacionada à falta de afinidade com as células espermáticas de *P. brevis*.

As taxas de fertilização alcançadas neste trabalho não foram altas. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a técnica empregada, a fertilização a seco. Um estudo comparando a fertilização a seco e a desova natural mostrou que, em quatro das cinco espécies utilizadas, a taxa de fertilização foi superior quando se utilizou a desova natural [14]. Uma possível explicação para esse fato é a manipulação dos gametas (particularmente ovócitos). Após a coleta, os gametas são expostos a condições desfavoráveis (como temperatura, oxigenação e dessecação), levando a uma redução da sua qualidade. Além disso, se a indução hormonal não for realizada no momento adequado os ovócitos podem não ser totalmente competentes para promover um desenvolvimento normal [4]. Contudo, a fertilização a seco apresenta vantagens e, por isso, é amplamente difundida na aquicultura. Dentre as principais vantagens, destacam-se a utilização mais eficiente do sêmen quando este é escasso, através de diluição ou de preservação [21] e a redução do número de reprodutores quando se tem a dose inseminante definida para a espécie [13]. Ademais, a utilização do sêmen descongelado somente é possível por meio da fertilização a seco. No presente trabalho, as taxas de fertilização não diferiram quando se utilizou sêmen *in natura* ou descongelado, portanto, infere-se que não foram as características seminais pós descongelamento que influenciaram a taxa de fertilização. No entanto, acredita-se que a melhoria da qualidade do sêmen descongelado utilizando-se ovócitos de qualidade superior, aumentará estas taxas.

Tabela 1. Média \pm desvio padrão da motilidade total, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP) e integridade de membrana do sêmen de *Prochilodus brevis* congelado em glicose associado a DMSO ou MG.

Parâmetro	Glicose + DMSO	Glicose + MG
Motilidade total (%)	63,95 \pm 15,89 ^a	25,37 \pm 3,54 ^b
VCL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	36,38 \pm 7,02 ^a	20,45 \pm 2,85 ^b
VSL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	19,26 \pm 2,75 ^a	3,03 \pm 1,41 ^b
VAP ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	25,70 \pm 6,51 ^a	6,90 \pm 1,12 ^b
Integridade de membrana (%)	63,58 \pm 6,95 ^a	35,58 \pm 11,27 ^b

Letras minúsculas sobrescritas (a, b) indicam diferença ($P < 0,001$) entre as colunas.

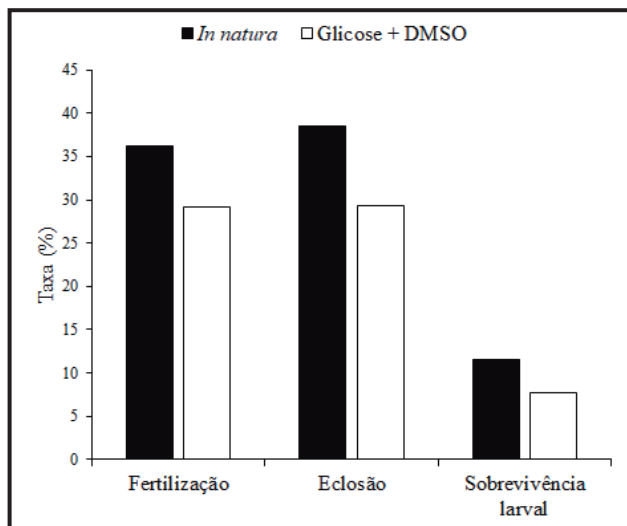


Figura 1. Média \pm desvio padrão das taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência larval de *Prochilodus brevis* após fertilização com sêmen *in natura* ou congelado em glicose + DMSO.

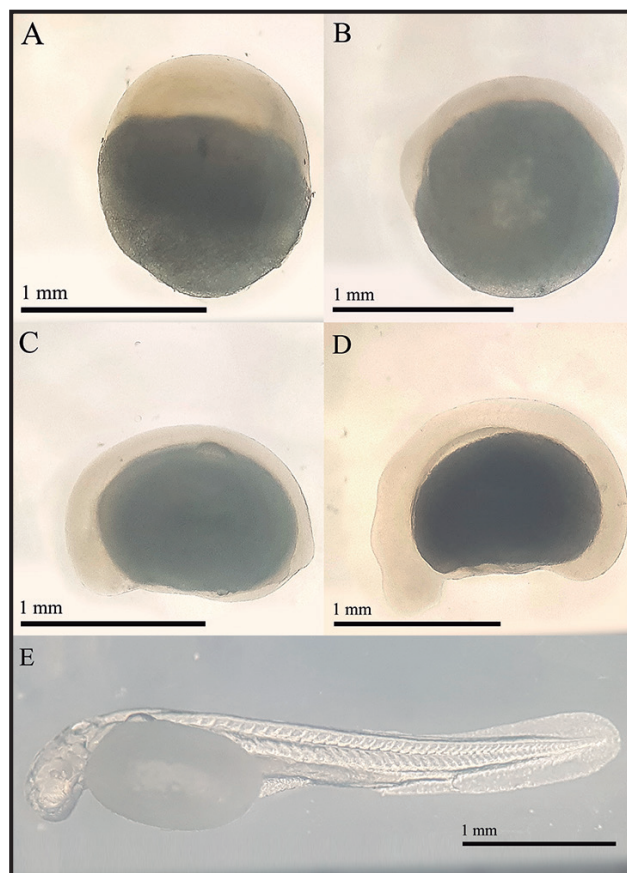


Figura 2. Fases do desenvolvimento embrionário: A- Blástula; B- Gástrula; C- Fechamento do blastóporo; D- Organogênese e E- Larva recém eclodida de *Prochilodus brevis* oriundos de fertilização com sêmen congelado em glicose + DMSO [Barra= 1mm].

Por conseguinte, um aspecto importante a ser considerado é a necessidade de se desenvolver um protocolo padronizado de congelamento [8] que promova alta capacidade fertilizante do sêmen após a descongelamento [3]. Para isso, cada etapa do processo de congelamento

deve ser definida. Este estudo baseou-se nos poucos trabalhos [6,12] disponíveis na literatura acerca da congelamento de sêmen de *P. brevis* e, apesar da escassez de estudos para essa espécie, estes trabalhos forneceram subsídios suficientes para a produção de larvas com sêmen descongelado, que representa um grande avanço rumo a padronização do protocolo para essa espécie.

A criopreservação é fundamental para a conservação do material genético a curto e longo prazo. No entanto, as células espermáticas são afetadas durante esse processo e há uma redução da qualidade seminal [5], sendo importante saber o quanto essa qualidade foi comprometida. Logo, os testes de fertilização são de grande relevância para mensurar a capacidade fecundante do sêmen congelado pois fornecem resultados mais acurados, não devendo ater-se apenas aos parâmetros de avaliação seminal *in vitro*.

Ressalta-se que mais esforços devem ser tomados a fim de melhorar a qualidade do sêmen congelado/descongelado, obtendo-se um maior número de larvas, por meio do aprimoramento desse protocolo. Portanto, aspectos como a proporção ideal entre espermatozoides e ovócito (dose inseminante), volume e composição da solução ativadora/solução de fertilização, outros meios de congelamento são perspectivas de pesquisa a serem consideradas.

CONCLUSÃO

Portanto, conclui-se que a utilização de sêmen congelado/descongelado de *Prochilodus brevis* tem poder fecundante, sendo viável para a produção de larvas desta espécie, indicando-se a utilização do diluidor composto por solução de 5% de glicose e 10% de DMSO.

MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA.

²Microptics. Barcelona, Spain.

³Vetec Química Fina Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Diadema, SP, Brazil.

Funding. Bolsa de estudos concedida pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Acknowledgements. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Ethical approval. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE), com o seguinte número de protocolo: 2397704/2016.

Declaration of interest. Os autores informam que não há conflitos de interesse. Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo e escrita do artigo.

REFERENCES

- 1 Almeida-Monteiro P.S., Oliveira-Araújo M.S., Pinheiro R.R.P., Lopes J.T., Ferreira Y.M., Montenegro A.R., Melo-Maciel M.A.P. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2017. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). *Semina: Ciências Agrárias*. 38(4): 2669-2680.
- 2 Alves D.E.O., Silva M.F.M., Molina W.F., Costa S.A.G.L. & Nascimento R.S.S. 2017. Desenvolvimento ontogenético inicial de *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) (Characiformes). *Biota Amazônia*. 6(1): 70-75.
- 3 Austuriano J.F., Cabrita E. & Horváth A. 2017. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*. 245: 69-76.
- 4 Bobbe J. & Labbé C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165(3): 535-548.
- 5 Cabrita E., Martínez-Páramo S., Gavaia P.J., Riesco M.F., Valcarce D.G., Sarasquete C., Herráez M.P. & Robles V. 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*. 432: 389-401.
- 6 Lopes J.T., Pinheiro J.P.S., Nunes L.T., Pinheiro R.R.R., Souza M.E.M., Almeida P.S., Nascimento R.V., Campello C.C. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2014. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 38(3): 170-175.
- 7 Lovelock J.E. & Bishop M.W.H. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 183(4672): 1394-1395.
- 8 Martínez-Páramo S., Horváth A., Labbé C., Zhang T., Robles V. Herráez P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T.R. & Cabrita E. 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. 472: 156-177.
- 9 Moore J.C., Berlow E.L., Coleman D.C., Ruiter P.C., Dong Q., Hastings A., Johnson N.C., Mccann K.S., Melville K., Morin P.J., Nadelhoffer K., Rosemond A.D., Post D.M., Sabo J.L., Scow K.M., Vanni M.J. & Wall D.H. 2004. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters*. 7: 584-600.
- 10 Nascimento M.M., Nascimento W.S., Chellapa N.T. & Chellapa S. 2012. Biologia reprodutiva do curimatã comum, *Prochilodus brevis* (Characiformes: Prochilodontidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amazônia*. 2(2): 31-43.
- 11 Nascimento R.V., Leite-Castro L.V., Montenegro A.R., Oliveira-Araújo M.S., Lopes J.T., Almeida-Monteiro P.S., Ferreira Y.M. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2017. Influência do tempo de resfriamento e soluções diluentes sobre a congelabilidade do sêmen de *Prochilodus brevis*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45: 1480.
- 12 Nunes L.T., Oliveira M.S., Lopes J.T., Souza M.E.M., Pinheiro R.R.R., Campello C.C. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2016. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. *Semina: Ciências Agrárias*. 37(3): 1643-1654.
- 13 Oliveira-Araújo M.S., Salmito-Vanderley C.S.B., Almeida-Monteiro P.S., Lopes J.T. & Leite-Castro L.V. 2016. Dose inseminante e resfriamento de embriões de peixes de água doce. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 40(1): 35-40.
- 14 Reynalte-Tataje D.A., Lopes C.A., Ávila-Simas S., Garcia J.R.E. & Zaniboni-Filho E. 2013. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning? *Natural Science*. 5(7): 1-6.
- 15 Takagi M., Boediono A., Saha S. & Suzuki T. 1993. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology*. 30(3): 306-312.
- 16 Taylor B.W., Flecker A.S. & Hall Jr. R.O. 2006. Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. *Science*. 313(5788): 833-836.
- 18 Thirumala S., Campbell W.T., Vicknair M.R., Tiersch T.R. & Devireddy R.V. 2006. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*. 66(4): 964-973.
- 19 Viveiros A.T.M. & Godinho H.P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology Biochemistry*. 35(1): 137-150.
- 20 Viveiros A.T.M., Nascimento A.F., Leal M.C., Gonçalves A.C.S., Órfão L.H. & Cosson J. 2015. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiology Biochemistry*. 41(1): 193-201.
- 21 Zaniboni Filho E. & Weingartner M. 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(3): 367-373.