

## EFEITO DA AMIDAS DIMETILFORMAMIDA (DMF) NA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE CURIMBA (*PROCHILODUS LINEATUS*)

IZANI BONEL ACOSTA<sup>1</sup>; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER<sup>2</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>2</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – [izanibonel@hotmail.com](mailto:izanibonel@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – [stelagheller@hotmail.com](mailto:stelagheller@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, REPROPEL – Pelotas/RS – [corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Rio Grande – FURG- Rio Grande/RS – [varelajras@gmail.com](mailto:varelajras@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas que levam ao aumento da produção animal, seja para conservação de espécies passíveis de extinção ou espécies que servem para alimentação e para repovoamento, vai ao encontro de questões econômicas e ecológicas atualmente levantadas. Entre as espécies em destaque o Curimba (*Prochilodus lineatus*), possui ampla distribuição na América do Sul, sendo afetado pela intensa exploração e degradação dos ecossistemas (COSTA FILHO; GAYA, 2012).

O interesse pela preservação e intensificação nos estudos pela espécie ocorreu devido a sua alta prolificidade, crescimento rápido, elevada rusticidade e também por fonte de alimento para as espécies de peixes predadores (CEMIG/CETEC, 2000). A criopreservação espermática é considerada uma ferramenta para aumentar o manejo reprodutivo e consequentemente aumentar o número de juvenis produzidos a partir de fertilização artificial ajudando dessa forma na preservação da espécie.

No entanto, muitos estudos relatam danos em espermatozóides de peixes devido à criopreservação, afetando a motilidade, o metabolismo celular, estrutura da membrana plasmática, mitocôndrias, cauda e cromatina (VIVEIROS et al. 2012; CABRITA et al. 2010). Esses danos podem ser atenuados através do uso de crioprotetores. Um dos crioprotetores mais utilizadas são as amidas, que são compostos orgânicos de baixo peso molecular com elevada permeabilidade celular (HOLT, 2000). Este grupo funcional liga-se ao hidrogênio das moléculas de água, promovendo a formação de gelificação intracelular em vez de cristais de gelo, minimizando as lesões da membrana (BIANCHI et al. 2008).

Assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações (2, 5, 8 e 11%) de dimetilformamida (DMF), em células espermáticas de *P. lineatus* submetida no processo de criopreservação.

### 2. METODOLOGIA

Os reprodutores de *P. lineatus* (n=5), foram obtidos de uma piscicultura comercial, durante a estação reprodutiva (novembro a dezembro). A coleta de sêmen foi realizada através de massagem abdominal, evitando a contaminação por fezes e /ou urina (GODINHO et al. 2003). Para avaliação visual da motilidade espermática, se utilizou como agente ativador água destilada com taxa de diluição 1:4 (sêmen: agente ativador). Apenas amostras que apresentavam motilidade acima de 80% /10 s de ativação foram criopreservadas. As amostras foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: diluente; v: v) em solução base diluente base BTS com pH

7.2 e 318mOsm/Kg, contendo concentrações dos crioprotetores: DMSO ( $\text{CH}_3)_2\text{SO}$ , 10% (controle) e dimetilformamida ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ ) nas concentrações (2, 5, 8, 11%), envasadas em palhetas de 250  $\mu\text{L}$  para o congelamento (VARELA JR et al. 2012). As palhetas foram descongeladas em duplicatas em cada macho para cada tratamento em temperatura de 45°C/5s (STREIT JR et al. 2006). O conteúdo de cada amostra foi novamente ressuspensa em eppendorf contendo 400 $\mu\text{L}$  de BTS (com pH 7.2 e 318mOsm/Kg), a uma temperatura de 22°C para minimizar a toxicidade do crioprotetor após o descongelamento.

Após o descongelamento do sêmen, foi feita a análise dos parâmetros como taxa de motilidade, tempo de motilidade, funcionalidade de mitocôndria.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioteχνologias de criopreservação constituem uma ferramenta que auxilia na rotina de reprodução (VIVEROS et al. 2012), podem, do auxiliar na conservação da variabilidade genética, assim como reposição dos estoques naturais através da formação de bancos de germoplasma (CABRITA et al. 2010).

**Tabela 2.** Efeito de diferentes concentrações de dimetilformamida (DMF) e Dimetilsulfóxido DMSO, na concentração de 10%, em amostras de sêmen de Currimba (*P. lineatus*), criopreservadas sob parâmetros funcionalidade de mitocôndria (MI), taxa de motilidade e tempo de motilidade, resultados expressos em porcentagem (média  $\pm$  desvio padrão da média).

Crioprotetores	(%)	MI (%)	Taxa Motilidade (%)	Tempo Motilidade (s)
DMSO	10	37,6 $\pm$ 39,9 <sup>B</sup>	18,0 $\pm$ 16,4 <sup>BC</sup>	16,8 $\pm$ 15,3 <sup>AB</sup>
DMF	2	87,0 $\pm$ 0,0 <sup>A</sup>	26,0 $\pm$ 8,9 <sup>B</sup>	21,4 $\pm$ 7,5 <sup>AB</sup>
	5	78,0 $\pm$ 4,8 <sup>AB</sup>	64,0 $\pm$ 8,9 <sup>A</sup>	28,6 $\pm$ 3,7 <sup>A</sup>
	8	67,4 $\pm$ 32,0 <sup>AB</sup>	62,0 $\pm$ 30 <sup>A</sup>	29,6 $\pm$ 5,3 <sup>A</sup>
	11	47,6 $\pm$ 16,0 <sup>AB</sup>	42,0 $\pm$ 26,8 <sup>AB</sup>	15,2 $\pm$ 8,6 <sup>AB</sup>

<sup>A,B,C</sup> Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P<0.05).

Em peixes de água doce, a motilidade do esperma é ativada quando entra em contato com a água do meio ambiente (meio hipoosmótico) (MORISAWA ET AL. 2003), e a motilidade é o parâmetro mais utilizado para avaliar a qualidade do esperma. As mitocôndrias têm relação direta com a quantidade de ATP disponível, a qual se faz necessária para a manutenção da motilidade e tempo de motilidade espermática, mas mesmo essas estando superiores ao controle, não evidenciam diferença estatística para motilidade e tempo de motilidade espermática no DMF 2%. ALVES et al. 2016 também encontrou resultados similares, com outra espécie de peixe de água doce, o qual DMF não reduziu a taxa de motilidade após o descongelamento embora na literatura observa-se que os parâmetros de motilidade diferem entre as espécies (FABBROCINI et al. 2000; TIAN et al. 2008; IRAWAN et al. 2010).

### 4. CONCLUSÕES

O uso de amidas como crioprotetor mostrou-se eficaz nos parâmetros testados, apresentando resultados superiores ao controle (DMSO) normalmente utilizado em peixes de água doce. Recomenda-se com os resultados obtidos nestas condições experimentais o uso da amida DMF, nas concentrações de 2,5 e 8%, para protocolos de criopreservação seminal de Curimba (*Prochilodus lineatus*).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.P. ; Corcini, C.D. ; SILVA, E.F.E.; CALDAS, J.S.; CARDOSO, T.F.; PIEDRAS, S.R.N.; JARDIM, R.D.; VARELA JR, A.S. **The role of amides in seminal cryopreservation of wild silverside, *Odontesthes bonariensis***. Cryobiology, v. 73, p. 3, 2016.

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. Revista Brasileira Zootecnia. 32, 1537-543, 2003.

HORVATH, A.; URBANYI, B. **The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm**. Aquaculture Research, 31:317-324, 2000.

BAULNY, O.B.; LABBE, C.; MAISSE, G. **Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants**. Cryobiology. 39:177–184, 1999.

RICHARDSON, G.F.; MILLER, T.I.; MCNIVEN, M.A. **Cryopreservation of artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw**. Aquacult Research. 31:307-315, 2000.

STREIT JR, D.P; BENITES, G.V; MORAES, R.P; RIBEIRO, E.S; SAKAGUTI & R.F CALDIERI. **Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos**. Ciência Animal Brasileira 7: 289-297, 2006.

VARELA JR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; T. LUCIA JR, T.; STREIT, D.P.; FIGUEIREDO, M.R.C. **Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum***, Theriogenology 78, 244–251, 2012.

ALVAREZ, J.G. Aplicações clinicas Del estudio de fragmentacion Del ADN espermático. Ver. Int. Androl. 5 (2007) 354–363.

Rowland, A.A., Voeltz, G.K. **Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction**. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 13 (2012) 607–625.

Tian, Y.S; Chen, S.L.; Ji, X.S.; Zhain, J.M.; Sun, L.J.; Chen, C.; Su, P.Z. **Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm**. Aquaculture 284 (2008) 268–271.

Fabbrocini, A.; Lavadera, S.L.; Rispoli, S.; Sansone, G. **Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa**. Cryobiology 40 (2000) 46–53.

Van Meer, G.; Voelker, D.R.; Feigenson, G.W. **Membrane lipids: where they are and how they behave**. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9 (2008) 112–124.

Irawan, H. Vuthiphandchai, V.; Nimrat, S. The effect of extenders, cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Anim. Reprod. Sci. 2010, 236–243.



BIANCHI, K. CALDERAM, E.F. MASCHIO, E.M. MADEIRA, R. ULGUIM, C.D. CORCINI. **Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation.** Theriogenology. 69, 632– 8, 2008.

, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., HERRÁEZ, M.P. **Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives.** J. Appl. Ichthyol 26: 623–635, 2010.

COSTA FILHO, J.; GAYA. L.G. **Abordagens recentes do melhoramento genético de peixes.** Ambiência, Guarapuava, v. 8, n. 1, p.195-210, jan/abr. 2012.

GUIA ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000.

HOLT, W.C. **Basic aspects of frozen storage of semen,** Animal Reproduction Science, 62 3–22, 2000.

**(Characiformes).** Theriogenology 78 361–368, 2012.