

## EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE DIMETILACETAMIDA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE GAMETAS DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*LEIARIUS MARMORATUS*)

CAROLINE SILVEIRA PINHEIRO<sup>1</sup>; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER<sup>2</sup>,  
FERNANDA SERAFINI MACHADO<sup>2</sup>, IZANI BONEL ACOSTA<sup>2</sup>, ANTONIO  
SERGIO VARELA JUNIOR<sup>3</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolinezoo2014@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – stelagheller@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – fmserafini@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Rio Grande – varelajras@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – corcincid@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira apresenta-se em crescimento nos últimos anos, com destaque para as espécies nativas de água doce, como o Jundiá Amazônico (*Leiarius marmoratus*), segundo SAINT-PAUL (2017) possuindo grande importância na piscicultura nacional. Neste contexto, a criopreservação espermática é uma técnica de grande interesse, pois além de otimizar o manejo reprodutivo e o desenvolvimento de programas de melhoramento animal (CABRITA et al. 2010), ainda reduz problemas de assincronia entre macho e fêmeas.

O sucesso da criopreservação espermática depende da composição dos diluentes, concentração e tipo/classe química dos crioprotetores (DEGRAAF e BERLINSKY, 2004). Para o congelamento de sêmen de peixes de água doce nativos, o crioprotetor interno mais utilizado é o Dimetilsulfóxido – DMSO em concentrações de 5 – 15% (VIVEIROS e GODINHO, 2009) associado ao meio diluente BTS (Beltsville Thawing Solution®).

A dimetilacetamida (DMA) é um composto orgânico, líquido, do grupo das amidas utilizado como crioprotetor interno, tendo esse grupo sendo testado com resultados satisfatórios em diferentes espécies de peixes (OGIER DE BAULNY et al. 1999; VARELA JR et al. 2012). Com o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de dimetilacetamida, associados ao meio diluente BTS, sob parâmetro *in vitro* de motilidade espermática (total, progressiva e tempo de motilidade) em Jundiá Amazônico (*Leiarius marmoratus*).

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados 8 reprodutores de *L. marmoratus* da Piscicultura Boa Esperança - Pimenta Bueno, RO, Brasil. A coleta de sêmen foi realizada por massagem abdominal (BILLARD et al. 1995), posterior indução hormonal - 1 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de animal vivo, diluída em 0,5 mL de solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl). Antes da criopreservação foi avaliada a motilidade e tempo de motilidade de cada amostra seminal, sendo descartado quando verificada a ativação espermática devido à contaminação

por urina, fezes ou água. Após constatar que não ocorreu ativação, a motilidade foi avaliada colocando-se 1 µl de sêmen e 49 µl de água destilada (25° C) em lâmina sob lamínula, em microscópio óptico de contraste de fases (BX 41 Olympus®, 400x). Para criopreservação, foram utilizadas somente amostras que apresentaram motilidade acima de 80%, 10s após a ativação com água destilada. Para avaliar o tempo de motilidade, foi mensurado o tempo desde a ativação até a parada total da movimentação espermática (segundos).

As amostras foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: diluente) em solução base diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) como indica PURSEL e JOHNSON, 1975 em diferentes concentrações dos tratamentos dimetilacetamida (2,5,8 e 11%), e tratamento controle dimetilsufóxido (15%), nas concentrações em meio diluído com BTS, e envasadas em palhetas de 250 µL segundo VARELA JR. et al. (2012). Em seguida, as amostras foram congeladas por 12h em um “dry-shipper”, e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até o descongelamento.

Para descongelamento, as palhetas foram submergidas em banho-maria (38°C) por 8 segundos e, em seguida, analisada a qualidade seminal. Amostras de duas palhetas de cada tratamento de cada macho foram descongeladas, diluídas novamente em 400 µL de BTS (1:3) a 22 °C.

A motilidade espermática foi realizada através do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), sendo realizada após ativação seminal utilizando solução de ativação e sêmen (4:1) respectivamente, em uma lamina de microscopia óptica sendo recoberta por lamínula.

O tempo de motilidade espermática foi verificado através de cronômetro acionado quando colocado 1 µL de sêmen em contato com 4µL de solução de ativação em uma lâmina de microscopia ótica registrando o tempo decorrido até que a taxa de motilidade tenha porcentagem de 10%.

Para o teste estatístico se realizou a análise de normalidade para todas as variáveis dependentes, pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida foi realizado análise de variância com subsequente comparação entre as médias através do teste de Tukey. Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (S.E.M.). Todas as análises foram realizadas no software Statistix 9.0 (2010).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o sêmen fresco, o volume médio foi de  $4,5 \pm 0,3$  mL, concentração espermática de  $8,7 \pm 0,2 \times 10^9$ /mL, motilidade espermática de  $95,7 \pm 2,0\%$  e o tempo de motilidade foi  $122,6 \pm 5,0$  segundos.

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilacetamina (DMA) sob *parâmetros in vitro* de motilidade total (Mot Total), motilidade progressiva (Mot P) e tempo de motilidade (T Mot) (média  $\pm$  erro padrão da média) em amostras de sêmen criopreservadas de Jundiá Amazônico (*Leiarius marmoratus*).

Crioprotetor	[ ]	Mot Total (%)	Mot P (%)	T Mot (s)
DMSO	15%	26.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	19.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 10 <sup>e</sup>
	2%	8,5 $\pm$ 1.4 <sup>d</sup>	4.8 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	27.1 $\pm$ <sup>d</sup>
	5%	27,5 $\pm$ 2.9 <sup>ac</sup>	23.5 $\pm$ 3 <sup>ca</sup>	155 $\pm$ 9 <sup>abc</sup>
DMA	8%	25.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	20.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	132 $\pm$ 8.8 <sup>ac</sup>
	11%	32.9 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>	28.9 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	151 $\pm$ 8.9 <sup>abc</sup>

Expoentes diferentes na mesma coluna, indicam diferença estatisticamente (P < 0,05).

O efeito superior observado no tratamento com DMA a 11%, em relação ao tratamento controle DMSO 15%, pode ser devido ao menor peso molecular, da amida em relação ao DMSO, promovendo assim uma rápida interação com a água. Portanto, o efeito crioprotetor das amidas pode ser atribuído a reduzida formação dos cristais de gelo, pois a alta interação com a molécula de água propicia a formação de micro-cristais intracelular.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a utilização do tratamento com DMA a 11% obteve resultado positivo quando comparado ao tratamento controle DMSO, considerando-se análise *in vitro* e condições experimentais testadas neste estudo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. Broodstock management and seed quality-General considerations. In: BROMAGE, N & RJ ROBERTS. **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. Cap.3, p. 1-24.

CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M.P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Review article. Journal of Applied Ichthyology**, Berlin v.26, n.5, p.623-635, 2010.

DEGRAAF, J.D.; BERLINSKY, D.L. Cryogenic and refrigerated storage of rainbow smelt *Osmerus mordax* spermatozoa. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.35, n.2, p. 209–216, 2004.

OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus*



*glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v.39, n.2, p.177-184, 1999.

PURSEL, V.G.; JOHNSON. L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Jornal of Animal Science**, Oxford, v.40, n.1, p.99-102, 1975.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, Sergipe, v.5, n.1, p.1-9, 2017.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA JR, T.; STREIT JR, D.P.; FIGUEIREDO, M.R.C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, Los Altos, v.78, n. 2, p. 244-251, 2012.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n.1, p.137–150, 2009.