

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

**CAROLINE SILVEIRA PINHEIRO¹; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER²,
FERNANDA SERAFINI MACHADO², IZANI BONEL ACOSTA², ANTONIO
SERGIO VARELA JUNIOR³; CARINE DAHL CORCINI⁴**

¹Universidade Federal de Pelotas – carolinezoo2014@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – stelagheller@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fmserafini@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

³Universidade Federal de Rio Grande – varelajras@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@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 μ l de sêmen e 49 μ l 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 μ L 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 submersas 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 μ L 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 lâmina de microscopia óptica sendo recoberta por lamínula.

O tempo de motilidade espermática foi verificado através de cronômetro acionado quando colocado 1 μ l de sêmen em contato com 4 μ L 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 \pm 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 ± erro padrão da média) em amostras de sêmen criopreservadas de Jundiá Amazônico (*Leiarius marmoratus*).

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

Exponentes 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.