

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE AGRONOMIA**

**EFEITO DE CRIOPROTETORES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE
TILÁPIA-DO-NILO**

Marcela Borges Corrêa

**BRASÍLIA, DF
2017**

MARCELA BORGES CORRÊA

EFEITO DE CRIOPROTETORES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheira Agrônoma

Orientador:
PROF. Dr. **RODRIGO DIANA NAVARRO**

BRASÍLIA, DF
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

CC824e Corrêa, Marcela Borges
 Efeito de crioprotetores na qualidade do sêmen de
 tilápia-do-Nilo / Marcela Borges Corrêa; orientador Rodrigo
 Diana Navarro. -- Brasília, 2017.
 33 p.

 Monografia (Graduação - Agronomia) -- Universidade de
 Brasília, 2017.

 1. Tilápia. 2. Criopreservação. 3. Metanol e
 Dimetilacetamida. I. Navarro, Rodrigo Diana, orient. II.
 Título.

Cessão de direitos

Nome do Autor: Marcela Borges Corrêa

Título: Efeito de crioprotetores na qualidade do sêmen de Tilápia-do-Nilo

Ano: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desse relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva - se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte desse relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Marcela Borges Corrêa

**EFEITO DE CRIOPROTETORES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE
TILÁPIA-DO-NILO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Orientador

Msc. Adalmyr Moraes Borges
Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural -
EMATER
Examinador

Prof. Dr. Clayton Quirino Mendes
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –
Universidade de Brasília
Examinador

Msc. Murilo Luiz e Castro Santana
Faculdade UnB Planaltina
Examinador

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília pela oportunidade concedida para realização do Curso de Agronomia.

Agradeço ao meu pai, José Bento Corrêa, engenheiro agrônomo, por todo o apoio, dedicação e ensinamentos no decorrer da graduação e na realização deste trabalho.

À minha mãe, Nelma Jane Borges da Silveira e aos meus irmãos, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar-me na realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro, pela oportunidade, dedicação, e compreensão durante o período de elaboração do trabalho.

À minha amiga, Laura Schmorantz, pela contribuição valiosa em todas as etapas de escrita do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Karina, Marcela, Bruna, Vinicius, Viviane, Adalmyr e Michelli, pelos ensinamentos e constante dedicação durante esta fase tão importante da minha formação.

Aos meus amigos e colegas de curso, Amanda, Hyan, Kenji, João Paulo, Karoline, Kariny e Rosil, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Agradeço também à banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca da monografia

RESUMO

Efeito de crioprotetores na qualidade do sêmen de Tilápia-do-Nilo criopreservado

Amostras do sêmen de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram avaliadas para verificar a qualidade do sêmen criopreservado com metanol e dimetilacetamida – DMA nas concentrações de 7,5% e 10%. A solução diluidora (base) para cada crioprotetor consistiu de BTS - *Beltsville Thawing Solution*. Foram examinados os fatores motilidade, vigor, duração de motilidade, sendo o sêmen ativado com bicarbonato de sódio 1%. Os resultados foram superiores do metanol com relação ao vigor e do metanol a 7,5% com relação à taxa de motilidade e duração de motilidade. O processo de criopreservação elevou o número de patologias morfológicas, basicamente cauda fraturada, cabeça isolada e cauda dobrada, exceto para o tratamento com DMA 7,5%.

Palavras-chave: Tilápia; Criopreservação; Metanol; Dimetilacetamida

ABSTRACT

Effect of cryoprotectants on the quality of cryopreserved Nile Tilapia semen

Semen samples of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) were evaluated in order to assess the quality of the semen cryopreserved with methanol and dimethylacetamide (DMA) as cryoprotective agents, at the concentrations of 7.5% and 10% each. The diluent (base) used in each cryoprotectant consisted of *Beltsville Thawing Solution* (BTS). It was conducted an examination of motility, robustness and motility duration factors, using sodium carbonate (at 1% solution) for semen activation. The results were higher in methanol regarding robustness and 7.5% methanol in relation to motility rate and motility duration. The cryopreservation process increased the number of morphological pathologies, basically fractured tail, isolated head and folded tail, except for treatment with DMA 7.5%.

Keywords: Tilapia; Cryopreservation; Methanol; Dimethylacetamide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média de taxa de motilidade (%), vigor (0-5) e duração (segundos) de motilidade dos espermatozoides <i>in natura</i> e após descongelamento.....	23
Tabela 2 - Médias de características morfológicas de espermatozoides de tilápia-do-Nilo <i>in natura</i> e após descongelamento.....	25

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Tilápia – taxonomia.....	13
3.2. Mercado.....	13
3.3. Reprodução.....	14
3.3.1. Fatores ambientais.....	14
3.3.1.1. Fotoperíodo.....	14
3.3.1.2. Temperatura.....	15
3.3.1.3. Salinidade.....	15
3.4. Biologia seminal.....	15
3.4.1. Concentração.....	16
3.4.2. Motilidade.....	16
3.4.3. Morfologia.....	17
3.5. Banco de sêmen.....	17
3.6. Criopreservação.....	17
3.7. Crioprotetores.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	30
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXO.....	34

1 INTRODUÇÃO

A pesca, entendida como uma atividade extrativista, de obtenção de pescados do ambiente natural, e a aquicultura, uma atividade comercial, de cultivo de organismos aquáticos, na maior parte dos casos sob confinamento, se constituem em importantes fontes de alimentos, nutrição, meio de vida e sustento de expressivo contingente populacional no mundo.

O aumento da oferta mundial de peixes nos últimos anos deve-se basicamente ao crescimento da aquicultura. Em 2014 atingindo-se um marco importante: a produção do setor aquícola, no que corresponde ao fornecimento de pescado para consumo humano, passou a superar a obtenção por captura. Nesse sentido, a China foi a responsável por mais de 60% desta produção (FAO., 2016).

A oferta de peixes destinado ao consumo humano tem superado nos últimos cinquenta anos o crescimento populacional. Assim, o consumo *per capita* aumentou significativamente, de 9,9 kg na década de 1960 a mais de 20 Kg a partir de 2015 (FAO., 2016).

Ainda segundo dados da FAO (2016), o pescado destinado ao consumo humano constitui-se em um dos produtos mais comercializados no mundo, em especial nos países em desenvolvimento, que são responsáveis por mais de cinquenta por cento do valor das exportações. Essa situação merece especial atenção devido a que, em setembro de 2015, os estados membros das Nações Unidas aprovaram a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável que, entre outros, fixa objetivos relativos à contribuição e prática da pesca e da aquicultura para a segurança alimentar e nutrição na utilização dos recursos naturais, de modo a garantir um desenvolvimento sustentável em termos econômicos, sociais e ambientais.

Nesta perspectiva, ao avaliar a grande diversidade de peixes presentes nas bacias hidrográficas brasileiras é notório o enorme potencial produtivo de espécies nativas. Porém, a situação atual expõe a necessidade de desenvolver mais conhecimento e tecnologia para o setor. Segundo a EMBRAPA (1016), nessas bacias destacam-se 52 espécies nativas (como tambaqui, pacu, mantrixã, surubins, cachara),

havendo necessidade de obtenção ou consolidação de tecnologia de produção para as diferentes fases de cultivo.

Já a produção aquícola de espécies exóticas está bem mais avançada. Conforme dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a mesma representou, entre 2007 e 2010, 65% do total produzido pela piscicultura brasileira, basicamente por possuírem para algumas espécies, como a tilápia, cadeia produtiva organizada e tecnologia de produção desenvolvida, redundando em menor custo de produção e, portanto, preços mais baixos, bem como maior oferta de peixes em quantidade e qualidade.

Hoje, conforme informações da EMBRAPA (2016), a pesquisa está direcionada para: reprodução e melhoramento genético; nutrição e alimentação de espécies aquícolas; produção de rações considerando, além da sustentação dos peixes, os impactos ambientais; conservação e manejo de recursos pesqueiros; sanidade das espécies; processamento agroindustrial; sistemas de produção; tratamento e reuso de efluentes. As tilápias constituem um dos mais importantes grupos de peixes em termos de produção mundial, experimentando a produção brasileira franco crescimento, em função da crescente aceitação de seu consumo pela população. A reprodução e a genética seletiva são temas importantes para pesquisa com vistas ao aumento da produção comercial da espécie no Brasil. Para tanto, a criopreservação de espermatozoides de tilápias é relevante para a conservação dos recursos genéticos, podendo muitas atividades ser desenvolvidas com o uso de sêmen congelado, possibilitando a obtenção em locais diferentes e o uso em trabalhos de melhoramento genético (GODINHO et al. 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade do sêmen *in natura* e criopreservado de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), para identificar qual dos crioprotetores, metanol ou dimetilacetamida, é mais eficaz para o processo de criopreservação.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os crioprotetores metanol e dimetilacetamida (DMA) em diferentes concentrações (7,5% e 10%);

Avaliar as taxas de motilidade, vigor, duração da motilidade e patologias morfológicas do sêmen criopreservado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tilápia – taxonomia

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Sub-Filo: Vertebrata

Super-Classe: Osteichthyes

Classe: Actinopterygii

Sub-Classe: Neopterygii

Infra-Classe: Teleostei

Super-Ordem: Acanthopterygii

Ordem: Perciformes

Sub-Ordem: Labroidei

Família: *Cichlidae*

Género: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

3.2. Mercado

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), por ser uma espécie que tem rápido crescimento, particularmente em sistema intensivo, por apresentar rusticidade e por possuir carne com boas características organolépticas, além de filé sem espinhos, é uma das espécies piscícolas mais promissoras (BOTARO et al., 2007).

A tilápia é dos peixes preferidos pelo mercado varejista dos Estados Unidos da América, maior mercado mundial para a espécie. As importações feitas da Ásia e da América Central, respectivamente para produto congelado e fresco. Na Europa a demanda de tilápia é reduzida, tendo as importações sofrido ligeira diminuição em 2015. Observa-se que a produção na América do Sul, África e Ásia tem aumentado significativamente, inclusive para fornecimento ao mercado dos países produtores. Registra-se, porém, que a China, um produtor importante, experimentou, em 2015, redução de produção e de elaboração de tilápia. É importante salientar que, devido ao fornecimento constante, os preços de importação sofreram diminuição na maioria dos mercados (FAO., 2016).

3.3 Reprodução

Segundo EI-SAYED (2006) a reprodução das tilápias pode ser feita de duas maneiras produtores de substrato e incubadores bucais.

Produtores de substrato:

Em espécies como *T. rendalli* e *T. zillii*, o macho e a fêmea irão construir ninhos para seus ovos, onde poderão protegê-los até que a fase larval seja atingida;

Incubadores bucais:

No gênero *Oreochromis* os machos constroem ninhos onde as fêmeas liberam seus ovos que logo serão fertilizados e depois recolhem os mesmos para fazer a incubação em sua boca. As espécies *O. niloticus*, *O. mossambicus* e *O. aureus* fazem parte desse grupo, onde apenas as fêmeas incubam os ovos na boca.

Espécies do gênero *Sarotherodon* têm seus ninhos feitos tanto pelos machos quanto pelas fêmeas e seus ovos são incubados pelos machos.

3.3.1. Fatores ambientais

O processo de reprodução dos peixes pode ser influenciado por estímulos a diferentes fatores ambientais como:

3.3.1.1. Fotoperíodo

O fotoperíodo exerce influência sobre a reprodução de peixes pois gera desenvolvimento gonadal, estimulando ou inibindo hormônios que liberam gonadotrofina (GnRH) e hormônios hipofisários (FHS e LH), entre outros ligados a reprodução e maturação dos gametas. (AMANO et al., 2004 citado por VERAS, G. C. ET AL., 2013).

Em análises realizadas por OKORIE (1973), observou-se que ocorre influência das fases da lua na reprodução de Tilápia-do-Nilo, e os resultados obtidos apontaram que, em relação a lua nova, o crescimento reprodutivo é maior durante a lua cheia.

Em testes feitos com o uso de lâmpadas para simulação de dias curtos, longos, normais e de iluminação constante, MENDOZA et al. (2003) observaram que a taxa de fecundidade em dias longos é significativamente maior que em dias curtos,

podendo, desta maneira, concluir que a dinâmica de desenvolvimento ovariano é influenciada pelo fotoperíodo.

3.3.1.2. Temperatura

A temperatura está ligada ao metabolismo e a reprodução de tilápias, que são peixes capazes de tolerar temperaturas abaixo de 40-42°C e acima de 16°C, reproduzindo-se bem em uma faixa de 20 a 35°C dependendo da espécie (EI-SAYED., 2006). A temperatura ótima para *P.niloticus* é em torno de 28 a 32°C (EL GAMAL., 1988 citado por EI-SAYED., 2006).

3.3.1.3. Salinidade

Segundo KUBITZA (2005), vários estudos apontam que a Tilápia do Nilo se reproduz melhor em água salgada quando comparada com água salobra e que as tilápias nilóticas são capazes de se reproduzir a salinidade em torno de 7 a 14 ppt. Kubitza (2005) observa, também, que a capacidade de sobrevivência em água salgada pode estar ligada a pureza genética de *O. niloticus*.

3.4 Biologia seminal

No que se refere a morfologia, NAGAHAMA (1983) explica que várias espécies de peixes teleósteos não possuem acrosoma, talvez pela presença da micrópila, que é uma abertura nos ovos de teleósteos por onde o esperma acessa o ovo, portanto, são formados por cauda, cabeça, pescoço e peça intermediária.

A motilidade do sêmen é ativada quando entra em contato com a água devido a sua sensibilidade à diferença de osmolaridade e às concentrações de íons (ALAVI; COSSON, 2005). A ativação pode também ser induzida com o uso de 1% de bicarbonato de sódio e solução salina fisiológica, que são mais indicados para sêmen criopreservado (CAROLSFELD, J., et al., 2003).

A qualidade do sêmen pode ser avaliada a partir de parâmetros como concentração, motilidade, morfologia, bem como conteúdo de energia, integridade da membrana e estado do DNA espermático (FAUVEL et al., 2010).

3.4.1. Concentração

Segundo FAUVEL et al. (2010) a concentração pode ser mensurada através de diferentes técnicas como contagem com o uso do microscópio, espectofotometria, citometria de fluxo e determinação dos valores de espermátocrito.

3.4.2. Motilidade:

A motilidade espermática varia de acordo com aspectos da célula, como: estrutura do flagelo, produção de ATP, estado da mitocôndria e atividade do canal de membrana plasmática, sendo, desta forma, um parâmetro de suma importância (CABRITA et al., 2010).

A motilidade pode ser avaliada com o uso de ativadores, sendo os mais comuns a água destilada, o cloreto de sódio (NaCl) a 3% de concentração e o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 1% de concentração. A duração da motilidade do esperma é medida com o uso de um cronômetro, acionado quando a solução ativadora entra em contato com o esperma e desligado quando apenas 5 a 20% das células espermáticas ainda estão se movendo (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

De acordo com COSSON (2004), danos osmóticos causados à estrutura celular do espermatozoide podem diminuir as taxas de motilidade.

A verificação visual da motilidade continua sendo bastante utilizada, porém, em muitos trabalhos recentes têm sido usados programas específicos de computador, como o CASA - Computer Assisted Sperm Analysis (FAUVEL et al., 2010). Esse sistema, todavia, não é de uso corrente devido ao custo dos equipamentos envolvidos (MELO-MACIEL et al., 2012).

As análises metodológicas da motilidade espermática em peixes vem do uso desses recursos em clínicas voltadas para a fertilidade de mamíferos e, por este motivo, teve que sofrer algumas alterações relacionadas ao tempo, pois, geralmente, a motilidade do esperma de peixes dura menos que dois minutos. O processo, em programas como o CASA, é feito com o uso de fitas de vídeo que são gravadas através de videomicroscópios em campo ou em laboratórios (KIME et al., 2001).

3.4.3. Morfologia:

A análise da morfológica dos espermatozoides é feita por meio da microscopia óptica, onde se observam algumas patologias que são ligadas ao processo de manipulação do sêmen durante sua coleta, entre elas a macrocefalia, microcefalia, flagelo quebrado, degenerado ou enrolado que são danos classificados como patologias secundárias. As patologias primárias são a cabeça isolada, flagelo dobrado e gotas próximas e distal, que são causadas por consanguinidade, estresse ambiental, enfermidades e restrições alimentares. (HERMAN et al., 1994 citado por MELO-MACIEL et al., 2012).

As patologias primárias ocorrem devido a problemas durante a espermatogênese, como estresse ambiental, restrição alimentar e enfermidades e as patologias secundárias estão relacionadas ao manejo durante a coleta (HERMAN et al., 1994, citado por MURGAS et al., 2011).

3.5. Bancos de sêmen

Bancos de sêmen têm como finalidade armazenar materiais genéticos congelados, que podem ser utilizados para programas de conservação de espécies e em atividades diversas de piscicultura. Podem ser feitos com a utilização de uma técnica aplicável, o uso de um refrigerador criogênico. Esse refrigerador consiste de um botijão contendo nitrogênio líquido, que mantém a temperatura de criopreservação, sem necessidade de reabastecimento por até três semanas, sendo, desta forma, muito usados para trabalhos de campo (GODINHO; AMORIM; PEIXOTO, 2003; RIBEIRO; GODINHO, 2003)

Na piscicultura os bancos de sêmen são utilizados para facilitar o estabelecimento de programas de melhoramento genético, redução de endogamia, sincronização reprodutiva entre machos e fêmeas e maior segurança quanto sanidade dos peixes. (RIBEIRO; GODINHO, 2003)

3.6. Criopreservação

A criopreservação torna possível a aplicação, já explicitada, em melhoramento genético para piscicultura, que beneficiam em especial a indústria da aquicultura. Entre eles podem-se citar a sincronização da disponibilidade dos gametas

para ambos os sexos, transporte de gametas de diferentes tratamentos, conservação de espécies e simplificação do manejo de prole (CABRITA et al., 2010).

MARIA e CARNEIRO (2012) descrevem o processo de criopreservação de sêmen de peixes, geralmente utilizado, respectivamente nas seguintes etapas: coleta de sêmen, avaliação microscópica da qualidade seminal, adição de diluidores e crioprotetores, envase, congelamento e armazenamento, descongelamento, fertilização e acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larval.

A conservação de sêmen de peixes é feita através da criopreservação com o uso de nitrogênio líquido a -196°C . Os tecidos vivos e a funcionalidade de células vão ser mantidos com o congelamento, porém, o desafio para que essa técnica tenha sucesso é evitar a formação de cristais de gelo e, desta forma, evitar danos conformacionais (MARIA; CARNEIRO, 2012).

STREIT JR et al (2009), observaram, com a criopreservação de sêmen de pacu com dimetilsulfóxido (DMSO), que, após o congelamento, os danos morfológicos aumentaram e que a taxa de motilidade diminuiu juntamente com o vigor, fatores esses que os autores relacionaram ao congelamento.

3.7. Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias que têm como finalidade proteger o tecido biológico, evitando danos causados pela formação de cristais de gelo e pela desidratação excessiva no processo de criopreservação.

Crioprotetores podem ser permeáveis, como metanol, demetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, ou impermeáveis, como gema de ovo, proteínas e leite. Teoricamente, quanto maior for sua concentração melhor será seu desempenho ao proteger células espermáticas, porém, altas concentrações de crioprotetores podem ser tóxicas ou letais para os espermatozoides, sendo a concentração ideal um valor que equilibre seus efeitos (YANG; TIERSCH, 2009).

Crioprotetores intracelulares são capazes de atravessar a membrana celular dirigindo-se ao interior das células, diminuindo a velocidade de formação de gelo no local e, conseqüentemente, reduzem a mudança de seu volume (MORAES, 2004

citado por SOUZA; AMARAL Jr., 2010). Entre os crioprotetores intracelulares está o metanol, que, segundo AMORIM (2012), é tóxico para muitas espécies, porém, não para o sêmen de tilápia.

Os crioprotetores extracelulares atuam de forma diferente, diminuindo os danos causados pelo congelamento, por meio do revestimento do exterior da célula, estabilizando-a (CAROLSFELD et al., 2003 citados por CARNEIRO., 2007). Quando é feita a combinação entre um crioprotetor interno e um externo a eficiência na proteção das células aumenta (Harvey, 1983 citado por Godinho et al., 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na empresa Companhia do Peixe (Cia – peixe), localizadas na zona rural da Cidade Ocidental - Goiás. Aprovado pela Comissão de Ética do Uso Animal (CEUA), protocolo nº 66 /2017.

Foram utilizados 10 reprodutores machos de Tilápia-do-Nilo. Os animais foram distribuídos em tanques de terra, em delineamento inteiramente ao acaso. Os animais foram alimentados com uma ração isoprotéica de 32 % de PB e isocalórica 3300 kcal de ED/kg.

Foi utilizado um puçá para a captura dos animais, que foram contidos por uma toalha de algodão seca. Os animais foram transferidos para caixas d'água contendo eugenol na dosagem de 65 mg por litro de água. Depois dos animais anestesiados foram realizadas as coletas individuais do ejaculado dos machos da seguinte forma: após a captura a papila urogenital foi limpa e seca com papel toalha; foram realizadas compressões manuais da parede celomática, no sentido crânio-caudal; O sêmen foi verificado quanto à contaminação ou ativação; quando ativado precocemente, o sêmen foi descartado; os ejaculados foram coletados em tubos de eppendorf, sendo acondicionados e imersos em gelo, ao abrigo da luz, para posterior análise laboratorial.

A análise da qualidade do sêmen *in natura* (e demais análises subsequentes) de cada macho utilizado, foi realizada em uma alíquota de 10 µL de sêmen depositada sobre lâmina de microscopia e observada ao microscópio de luz, previamente focalizada em aumento de 40X. O sêmen foi ativado mediante adição de bicarbonato de sódio à 1% na proporção 1:1 (sêmen: bicarbonato de sódio1%) para avaliação de sua qualidade.

Todos os ejaculados coletados foram analisados posteriormente e foi aferida a taxa (0-100%) e a duração (segundos) da motilidade espermática. A motilidade foi mensurada subjetivamente em microscópio de luz. A duração da motilidade foi avaliada da seguinte forma: um cronômetro foi acionado no momento da adição do agente de ativação e interrompido quando 10% dos espermatozoides ainda estavam se movendo.

Para análise de morfologia foram utilizadas amostras de sêmen "*in natura*". Uma alíquota de 10 µl de sêmen *in natura* foi diluída em 990 µl de solução de formol-citrato. A seguir, uma fração de 10 µl da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica

e coberta por lamínula. O exame consistiu na observação da morfopatologia de 200 espermatozoides focalizados em diversos campos ao longo de toda a lâmina. As análises morfológicas do sêmen "*in natura*" foram realizadas em microscópio óptico composto, com iluminação episcópica fluorescente (Nikon, modelo OPTIPHOT-2), no Laboratório de Aquicultura da UnB.

O sêmen *in natura* foi distribuído igualmente entre quatro tubos de eppendorf estéreis. Foi realizada a diluição lenta e gradativa das alíquotas por quatro soluções crioprotetoras, na proporção de uma parte de sêmen para nove partes de solução. As soluções foram compostas por dois crioprotetores, metanol e dimetilacetamida (DMA), em duas concentrações (volume: volume - v:v): 7,5% e 10%. A solução diluidora (base) para cada crioprotetor consistiu de BTS - Beltsville Thawing Solution (79,90 g de glicose; 12,71 g de citrato de sódio; 2,65 g de ácido etilenodiaminotetracético; 2,65 g de carbonato ácido de sódio; 159 g de cloreto de potássio e 0,50 g de sulfato de gentamicina).

Todas as soluções crioprotetoras foram preparadas com uma hora de antecedência da diluição para a estabilização dos crioprotetores ao término das reações exotérmicas prejudiciais às células espermáticas.

Após a diluição pelas soluções crioprotetoras, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml (duas palhetas por tratamento) que, por sua vez, foram vedadas com álcool polivinílico. As palhetas foram acondicionadas em raques e colocadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo dry shipper) para resfriamento. Após 24 horas, as raques foram transferidas para um botijão de armazenamento (Cryometal, modelo DS-18) e congeladas, permanecendo submersas em nitrogênio líquido. O descongelamento ocorreu no Laboratório de Aquicultura da Universidade de Brasília, sendo as palhetas descongeladas individualmente, por imersão em água (banho-maria) a 40°C, durante doze segundos, e agitadas durante todo o procedimento. A seguir foram enxugadas com toalha de papel, tendo sido descartada a extremidade com álcool polivinílico e o sêmen depositado em um tubo de eppendorf estéril. Uma alíquota de 10 µl de sêmen descongelado foi depositada sobre uma lâmina histológica previamente focalizada em microscópio óptico sob aumento de 100 dioptrias. Após confirmação da ausência de ativação, a amostra foi ativada mediante homogeneização com 40 µl de água

destilada ou solução de NaHCO₃ 1%. Foram comparadas duas escalas de valorização da motilidade do sêmen descongelado, uma quantitativa e outra qualitativa. Pela escala quantitativa, a motilidade espermática foi estimada em função da percentagem média de espermatozoides móveis observados em três campos. A escala qualitativa, foi atribuída ao vigor de motilidade dividido em categorias de 0 a 5, de acordo com seu desempenho. A duração (em segundos) da motilidade espermática também foi estimada desde a homogeneização com o ativador até que somente 10% dos espermatozoóides do campo se encontrassem móveis. Foram utilizadas as seguintes análises estatísticas: teste de média ANOVA e Tukey, considerando 1% e 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento são apresentados nas tabelas a seguir, que distinguem os diferentes tratamentos, basicamente dois crioprotetores, metanol e DMA – Dimetilacetamida, ambos com duas concentrações, 7,5 % e 10 %.

Tabela 1 - Média de taxa de motilidade (%), vigor (0-5) e duração (segundos) de motilidade dos espermatozoides *in natura* e após descongelamento.

Amostra	Taxa de Motilidade (%)	Vigor (0 - 5)	Duração da Motilidade (seg.)	
<i>In natura</i>	70,00±16,58	3,43±0,79	231,86±76,48	
Tratamentos	Taxa de Motilidade (%)	Vigor (0 - 5)	Duração da Motilidade (seg.)	
Metanol	7,5%	30,00±31,89 ^a	3,14±0,38 ^a	397,14±363,2 ^a
	10,0%	25,00±18,93 ^{ab}	3,00±0,58 ^a	228,86±128,93 ^{ab}
DMA	7,5%	4,43±2,88 ^{b*}	1,71±0,49 ^{b**}	100,29±28,74 ^{b*}
	10,0%	3,86±1,21 ^{b*}	1,57±0,53 ^{b**}	106,86±41,74 ^{b*}

Em uma coluna, valores com a mesma letra não diferem entre si; Letras seguidas de asterisco (*) significam P < 0,05); Letras seguidas de asteriscos (**) significam P < 0,01

Observa-se que o valor médio da taxa de motilidade dos tratamentos com metanol a 7,5% foi significativamente superior aos dos tratamentos com DMA, não havendo diferenças entre os demais tratamentos entre si (tabela 1).

Quanto ao vigor dos espermatozoides, os valores médios (Tabela 1), demonstram que os dois tratamentos com metanol apresentam resultados superiores com relação aos com DMA, não havendo diferença entre as concentrações de ambos.

Com relação à duração da motilidade, os valores médios, apresentados da Tabela 1, demonstram que o tratamento com metanol a 7,5% apresenta resultado significativamente superior aos criopreservados com DMA, não havendo diferença significativa entre as concentrações de metanol e entre o metanol a 10% e os tratamentos com DMA.

Quanto à morfologia dos espermatozoides, foram examinados os seguintes aspectos, com relação à amostra *in natura* e os quatro tratamentos: normal,

macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, peça intermediária degenerada, cauda fraturada, cauda fortemente enrolada, cauda degenerada, cabeça isolada norma, gota proximal, gota distal e cauda dobrada, cujos resultados são apresentados na tabela 2.

Quando relacionados à amostra *in natura*, os espermatozoides criopreservados com metanol a 7,5% apresentaram um quantitativo superior de indivíduos com cauda fraturada e cauda dobrada; com metanol a 10%, ocorreu um número inferior de normais e maior com cauda fraturada; com DMA 10% o número de normais foi menor, sendo maior o de cabeça isolada e cauda fraturada (Tabela 2).

Observa-se que as variações entre a amostra *in natura* e os tratamentos demonstram resultados negativos destes. Já entre os tratamentos não ocorreram diferenças.

Tabela 2 – Médias de características morfológicas de espermatozoides de tilápia-do-Nilo *in natura* e após descongelamento.

		Normal	Macrocefalia	Microcefalia	Cabaça degenerada	Peça intermediaria degenerada	Cauda fraturada
In natura		74,00±17,49	5,28±4,70	0,07±0,19	1,50±1,15	0,42±0,61	1,64±1,21
		Cauda fortemente enrolada	Cauda degenerada	Cabeça isolada normal	Gota proximal	Gota distal	Cauda dobrada
In natura		12,92±13,71	0,07±0,19	2,57±1,62	0,21±0,39	0,21±0,39	1,07±0,93
		Normal	Macrocefalia	Microcefalia	Cabaça degenerada	Peça intermediaria degenerada	Cauda fraturada
Metanol	7,5%	57,07±9,71	8,14±4,24	0,14±0,24	2,21±1,78	2,21±2,14	7,50±2,90
	10%	54,57±4,86	7,07±4,63	0,07±0,19	2,50±1,68	3,07±2,94	6,64±3,61
DMA	7,5%	59,28±10,69	8,14±4,84	0,21±0,57	1,29±0,64	2,00±3,38	6,29±3,24
	10%	53,28±11,52	7,42±5,72	0,00	1,07±1,06	1,21±1,95	8,07±3,61
		Cauda fortemente enrolada	Cauda degenerada	Cabeça isolada normal	Gota proximal	Gota distal	Cauda dobrada
Metanol	7,5%	12,14±7,34	0,14±0,24	6,07±2,51	0,14±0,24	0,21±0,39	4,00±0,93
	10%	15,14±4,55	0,29±0,57	7,21±2,08	0,07±0,19	0,00	3,36±3,16
DMA	7,5%	9,57±5,63	0,21±0,39	9,00±4,88	0,07±0,19	0,00	3,93±1,60
	10%	13,21±8,36	0,14±0,24	12,00±9,97	0,14±0,24	0,00	3,43±1,10

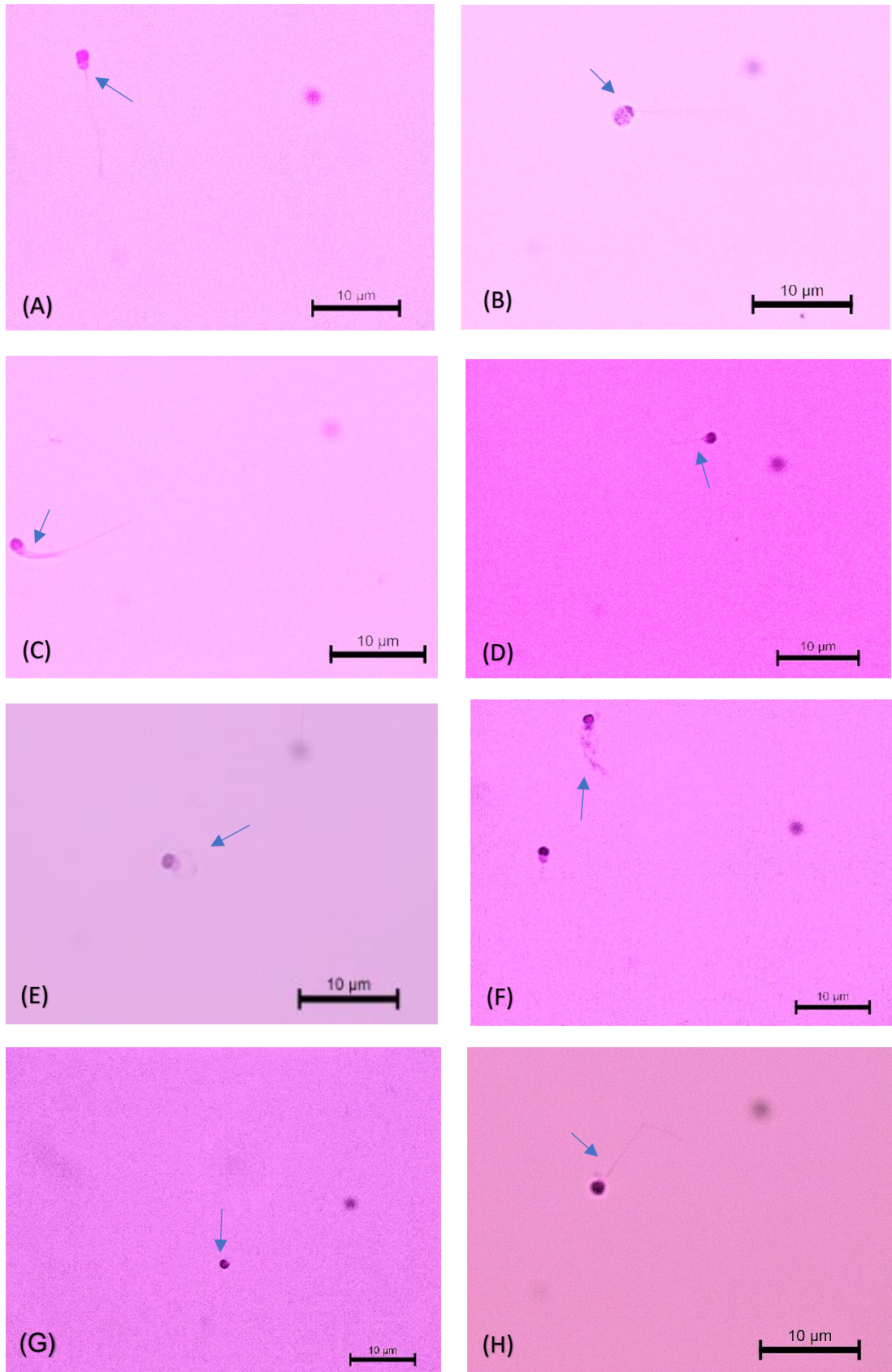


Figura 1. Imagens evidenciando espermatozoides com anormalidades indicadas por setas. (A) Macrocefalia; (B) Cabeça degenerada; (C) Peça intermediária degenerada; (D) Cauda fraturada; (E) Cauda fortemente enrolada; (F) Cauda degenerada; (G) Cabeça isolada e (H) Cauda dobrada.

6. DISCUSSÃO

Os valores de taxa de motilidade após o congelamento com uso de metanol a 7,5% como criopreservante foram superiores e significativos aos obtidos com DMA, tanto a 7,5% como 10%. Outro fator que pode justificar a baixa motilidade com o uso de DMA é sua alta toxicidade para tilápia-do-Nilo (AMORIM, 2002). GODINHO et al. (2003), ao avaliar taxas de motilidade de Tilápia-do-Nilo utilizando os criopreservantes metanol e DMSO, chegou a conclusões distintas, não tendo alcançado resultados significativos. Segundo VIVEIROS (2011), o metanol tem menor peso molecular em comparação ao DMA, o que faz com que atravesse a membrana celular com mais facilidade.

O vigor nos tratamentos com metanol apresentou diferença significativa em relação ao DMA. Outro estudo como o de STREIT JR et al (2009), com sêmen de pacu criopreservado com DMSO também relataram redução no vigor de suas amostras após o descongelamento e notaram que vigor e motilidade são fatores intimamente relacionados entre si, podendo ser resultantes de patologias morfológicas.

O metanol a 7,5% gerou resultados de duração de motilidade superior em relação às duas concentrações de DMA. Valores encontrados no presente estudo estão em desacordo e acima de MILIORINI (2006), que trabalhando com curimba (*Prochilodus lineatus*) e utilizando metanol e DMSO como crioprotetores, bem como ativador bicarbonato de sódio, obteve duração de 43 segundos com o uso de metanol a 7,5% e 54 segundos para o DMSO na mesma concentração.

Algumas patologias classificadas como secundárias são ligadas ao processo de manipulação do sêmen durante sua coleta, entre elas a macrocefalia, microcefalia, flagelo quebrado, degenerado ou enrolado. Já as patologias primárias, como cabeça isolada, flagelo dobrado e gotas proximal e distal são causadas por consanguinidade, estresse ambiental, enfermidades e restrições alimentares. (HERMAN et al., 1994 citado por MELO-MACIEL et al., 2012).

No trabalho o sêmen in natura apresentou, 26% de patologias morfológicas. As patologias que apresentaram maior ocorrência após o congelamento foram: cauda fraturada (secundária), cabeça isolada e cauda dobrada (ambas primárias).

7. CONCLUSÃO

A criopreservação do sêmen de Tilápia-do-Nilo com metanol nas concentrações de 7,5% apresentou melhores resultados para qualidade de sêmen.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes espécies possuem características para a criopreservação, influenciados especialmente pelo tipo de crioprotetore a concentração do mesmo, Neste sentido a criopreservação do sêmen de Tilápia-do-Nilo com metanol e DMA, nas concentrações de 7,5% e 10%, apresentou resultados significativos do metanol com relação ao DMA no que corresponde a vigor e do metanol a 7,5% no que corresponde a taxa de motilidade e a duração da motilidade.

O processo de criopreservação elevou o número de patologias morfológicas, basicamente cauda fraturada, cabeça isolada e cauda dobrada, exceto para o tratamento com DMA 7,5%. Quanto ao resultado entre os tratamentos não houve variações significativas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVI, Sayyed Mohammad Hadi; COSSON, Jacky. Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell biology international**, 2006, 30.1: 1-14.
- AMANO, Masafumi, et al. Effects of photoperiod on gonadotropin-releasing hormone levels in the brain and pituitary of underyearling male barfin flounder. **Fisheries science**, 2004, 70.5: 812-818.
- AMORIM, V.M.C. **Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica (Oreochromis niloticus), variedade chitralada**. 2002. 64f. dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BOTARO, Daniele, et al. Redução da proteína da dieta com base no conceito de proteína ideal para tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2007, 517-525.
- CABRITA, E., et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, 2010, 26.5: 623-635.
- CAMPOS-MENDOZA, Antonio, et al. Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. **Aquaculture**, 2004, 231.1: 299-314.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2007, 31.3: 361-366.
- CAROLSFELD, J., et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, 2003, 63.2: 472-489.
- COSSON, Jacky. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, 2004, 12.1: 69-85.
- EL GAMAL, A.-R. **Reproductive performance, sex ratios, gonadal development, cold tolerance, viability and growth of red and normally pigmented hybrids of *Tilapia aurea* and *T. nilotica***. PhD thesis, Auburn University 1988.
- EL-SAYED, Abdel-Fattah M. **Tilapia culture**. CABI, 2006.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesca e Aquicultura**. <Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>> Acesso em: 26 setembro 2017.
- ESPÉCIES – Piscicultura Pesca Maravilhosa. Foto 1, colo. Disponível em: <<https://pisciculturamaravilhosaesp.wordpress.com/1-tilapia-do-nilo/>> Acesso em: 06 de dezembro de 2017.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp
- FAUVEL, Christian; SUQUET, Marc; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, 2010, 26.5: 636-643

- GODINHO, Hugo Pereira; AMORIM, Vanessa Márcia da Cunha; PEIXOTO, Marco Túlio Diniz. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista brasileira de Zootecnia**, 2003, 32.6: 1537-1543.
- HARVEY, Brian. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture**, 1983, 32.3: 313-320.
- HERMAN, H.A; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. **Illinois: Interstate Publisher**, p.392,1994.
- KIME, D. E., et al. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 2001, 130.4: 425-433.
- KUBITZA, Fernando. **Tilápia em água salobra e salgada. Uma boa alternativa de cultivo** para, 2005. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/Paginas/Revistas/88/TilapiaAguaSalgada88.asp>> Acesso em: 10 de novembro de 2017.
- MARIA, Alexandre Nizio; CARNEIRO, Paulo César Falanghe. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Cienc. Anim**, 2012, 22: 124-131.
- MELO-MACIEL, Mônica Aline Parente, et al. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros. **Cienc Anim**, 2012, 22.1: 269-283.
- MORAES, G. F. de. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-acu *Leporinus macrocephalus***. 2004 68 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- NAGAHAMA, Yoshitaka. 6 The Functional Morphology of Teleost Gonads. **Fish physiology**, 1983, 9: 223-275.
- OKORIE, O. O. Lunar periodicity and the breeding of *Tilapia nilotica* in the Northern part of Lake Victoria. **EAST AFRICAN FRESHWATER FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION. Annual Report**, 1973, 50-58.
- RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 2003, 55.1.
- SILVA SOUZA, Maria Fernanda da; AMARAL JR, Hilton. Análise da técnica de criopreservação de sêmen do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) para a formação de um banco de germoplasma. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, 2010, 11.11.
- SOLIS-MURGAS, L. D., et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Rev Bras Reprod Anim**, 2011, 35.2: 186-191.

STREIT JR, Danilo P., et al. Motilidade, vigor e patologia seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim de Instituto de Pesca**, 2009, 35.1: 159-167.

VERAS, G. C., et al. Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. **Archivos de Zootecnia**, 2013, 62.237: 25-43.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça; GODINHO, Hugo Pereira. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2009, 35.1: 137-150.

YANG, Huiping; TIERSCH, Terrence R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 2009, 149.2: 224-232.

Anexo

Foto 1: Tilápia do Nilo
Fonte: ESPÉCIES – Piscicultura Pesca Maravilhosa

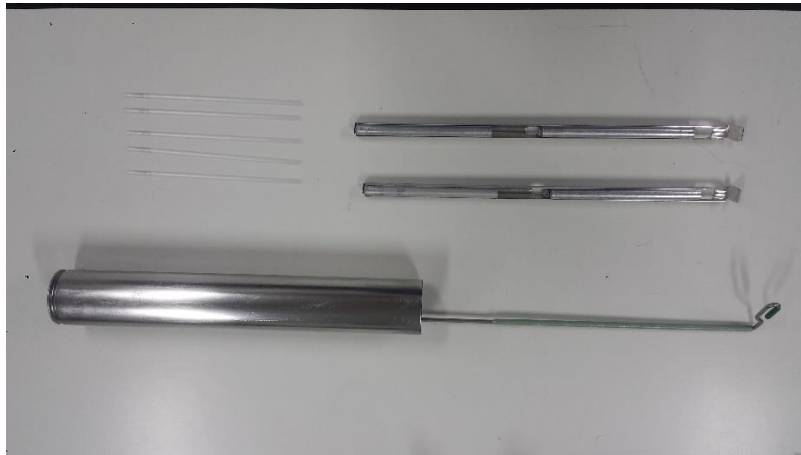


Foto 2: Palhetas, raques e caneca, utilizados no processo de criopreservação.
Fonte: Marcela Borges Corrêa



Foto 3: Botijão de nitrogênio
Fonte: Marcela Borges Corrêa