UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

HOMEOPATILA 100 NA QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO OU CONGELADO E NA HISTOLOGIA TESTICULAR DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Marcela Mataveli
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

MARINGÁ
Estado do Paraná
Outubro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

HOMEOPATILA 100 NA QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO OU CONGELADO E NA HISTOLOGIA TESTICULAR DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Marcela Mataveli
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração: Produção Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
Outubro – 2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Mataveli, Marcela
M425 *Homeopatila 100* na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Marcela Mataveli. -- Maringá, 2011.
35 f.

Orientador: Prof° Dr° Gentil Vanini de Moraes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)- Criopreservação. 2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)- Histologia testicular. 3. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)- Sêmen – Homeopatia – Qualidade. 4. Peixe - Leucócitos. 5. Peixe – Estresse. I. Moraes, Gentil Vanini, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. TÍTULO.

CDD 21. ed. 639.311

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

HOMEOPATILA 100 NA QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO OU CONGELADO E NA HISTOLOGIA TESTICULAR DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autora: Marcela Mataveli
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal

APROVADA em 07 de outubro de 2011.

Prof. Dr. Lauro Daniel Vargas Mendez

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Junior

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes
(Orientador)

A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha,
mas o que ele se torna.

John Ruskin

A minha amada mãe, Neide Cabral, aos meus saudosos avós, *in memoriam*, Atílio e Euridia Mataveli, e a minha querida tia, Luzia Mara Mataveli de Araujo,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bendito Deus, pelo fôlego da vida, pela dádiva da saúde, pela proteção, pelas bênçãos incontáveis, pelos desafios que me fizeram mais forte, pelas pessoas maravilhosas que encontrei em minha vida e me fizeram mais feliz.

A minha amada e guerreira mãe, Neide Cabral, pela vida, pelo amor, pela presença, pela credibilidade, pela generosidade, pela educação, pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A minha querida tia, Luzia Mara Mataveli de Araújo, pelo amor, pela generosidade, pela credibilidade, pela educação, pelos ensinamentos e pelo apoio em momentos importantes da minha vida.

Ao meu estimado e admirado orientador, Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes, pelos dez valiosos anos de orientação, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela credibilidade, pela generosidade, pelo profissionalismo indiscutível, pelo apoio, pela amizade, pela contribuição na minha formação profissional e pela imensa contribuição na realização deste estudo, que não seria possível sem seu empenho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Lauro Vargas, pelos ensinamentos e pela viabilização e execução do protocolo experimental deste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá e Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (Codapar/ UEM), pela execução do protocolo experimental deste estudo.

A Fundação Araucária, pelo financiamento deste projeto.

A Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pelos ensinamentos e contribuição neste estudo.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá e a laboratorista Zeni Maria Barbosa, pelos ensinamentos, pela amizade e pela contribuição na realização deste estudo.

Ao colega Pedro Luiz de Castro, pela alegria, pela disposição, pelo comprometimento e pela imensa contribuição em todas as etapas de execução deste estudo.

Ao colega Douglas Bianchini, o Clorofila, pelo comprometimento, pela imensa contribuição neste estudo.

A colega Graciela Lucca Braccini, pelo apoio na realização deste estudo.

A Pesquisadora da Embrapa Acre, Drª. Giselle Mariano Lessa de Assis, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo apoio e pela compreensão durante a realização deste estudo.

A analista da Embrapa Acre, Paola Cortez Bianchini, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo companheirismo e pelo apoio durante a realização deste estudo.

Aos meus queridos amigos pelo apoio, pelo companheirismo, pelos ensinamentos.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste estudo e pela minha formação profissional.

BIOGRAFIA

MARCELA MATAVELI, filha de Atílio Rodolfo Mataveli e Neide Cabral, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 16 de abril de 1982.

No ano de 2005, concluiu o curso de graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá.

No ano de 2006, iniciou o Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução Animal.

No ano de 2008, iniciou o Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução Animal.

No ano de 2009, foi contratada pela Embrapa Acre como analista da área de Conservação e Melhoramento Genético de Forrageiras.

No mês de fevereiro de 2011, submeteu-se à Banca de Qualificação de Doutorado, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

No mês de outubro de 2011, submeteu-se à Banca Examinadora de Tese, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

ÍNDICE

Página

LISTA DE TABELAS viii
LISTA DE FIGURAS ix
RESUMO x
ABSTRACT xii
I – INTRODUÇÃO 1
Referências .....
II – *HOMEOPATILA 100* NA QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO OU CONGELADO E NA HISTOLOGIA TESTICULAR DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) 14
Resumo 14
Abstract 15
Introdução 16
Material e Métodos 17
Resultados e Discussão 21
Conclusão 31
Referências 32

LISTA DE TABELAS

Página

II – *Homeopatila 100* na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Tabela 1 Composição e diluição do núcleo homeopático *Homeopatila 100*, por quilo de produto 18

Tabela 2 Composição do meio diluidor, com crioprotetor, para congelamento de sêmen de tilápias do Nilo 20

Tabela 3 Média estimada e erro-padrão dos teores de cortisol e de testosterona no soro de tilápias do Nilo, alimentadas com *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), durante 90 dias 22

Tabela 4 Média estimada e erro-padrão dos elementos de defesa do sangue de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), durante 90 dias 23

Tabela 5 Média estimada e erro-padrão da biometria do animal, da biometria das gônadas e do índice gonadossomático de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período 9 24

Tabela 6 Média estimada e erro-padrão da espessura do parênquima testicular e das características histológicas dos testículos de tilápias do Nilo, alimentados com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias 25

Tabela 7 Média estimada e erro-padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias 27

Tabela 8 Média estimada e erro-padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen descongelado de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias 29

LISTA DE FIGURAS

Página

II – *Homeopatila 100* na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Figura 1 Espermatogônias A nas gônadas de tilápias do Nilo alimentadas com 0 e 4% de *Homeopatila 100*/kg de ração, respectivamente, fotomicrografias (a) e (b). Coloração HE, em aumento de 40x e barra de 10 µm 26

RESUMO

A homeopatia estimula a energia vital do organismo sendo utilizada na profilaxia, no tratamento de doenças e na modulação de respostas orgânicas, principalmente, relacionadas ao estresse, que causa desequilíbrio orgânico prejudicando a reprodução. Desta maneira, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da homeopatia na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de tilápias do Nilo. Foram utilizados 320 machos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), linhagem GIFT, com seis meses de idade, com peso médio inicial de 93,12 ± 2,95g e comprimento total de 17,58 ± 1,12 cm, distribuídos, aleatoriamente, em quatro tratamentos: 1) controle; 2) adição de 2% de *Homeopatila 100*; 3) adição de 4% de *Homeopatila 100*; 4) adição de 6% de *Homeopatila 100*. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualisado e as variáveis resposta foram submetidas ao procedimento dos Modelos Lineares Generalizados. Verificou-se aumento (P<0,05) da condutividade elétrica com a alimentação com teores de *Homeopatila 100*, sendo 0,855 ± 0,006 µS/cm no controle, 0,862 ± 0,004 µS/cm com adição de 2% de *Homeopatila 100*/kg de ração, 0,868 ± 0,04 µS/cm com 4% *Homeopatila 100*/kg de ração e 0,874 ± 0,006 µS/cm com 6% *Homeopatila 100/*kg de ração. Verificou-se tendência na redução dos teores sorológicos de cortisol e testosterona com as dietas experimentais, com significância de (P<0,18) e (P<0,06), respectivamente. Os teores de cortisol foram 7,06 ± 1,26; 5,53 ± 1,50; 4,34 ± 1,80; 3,40 ± 2,16 µg/dL e os de testosterona foram 530,65 ± 1,36; 337,08 ± 1,07; 214,11 ± 0,84; 136,01 ± 0,67 ng/dL com alimentação com 0, 2, 4 e 6% de *Homeopatila 100*/kg de ração. Os monócitos foram reduzidos (P<0,07) com o aumento dos teores de núcleo homeopático na dieta, sendo 4,69 ± 0,12; 4,15 ± 0,08; 3,66 ± 0,09; 3,24 ± 0,15%. O índice gonadossomático aumentou (P<0,05) a ração com a adição de teores de *Homeopatila 100* na dieta, sendo 0,39 ± 0,28; 0,50 ± 0,18; 0,64 ± 0,15 e 0,83 ± 0,22. O percentual de espermatogônias A aumentou (P<0,05) até o teor de 4% de *Homeopatila 100*/kg de ração, com 6,23 ± 1,83; 8,58 ± 2,15; 8,93 ± 2,19. Conclui-se

que a adição de 6% *Homeopatila 100* aumentou o índice gonadossomático sendo recomendada para reprodutores de *O. niloticus*.

Palavras-chave: Criopreservação, estresse, homeopatia, leucócitos, peixe

ABSTRACT

Homeopathy stimulates the body's vital energy being used for prophylaxis, treatment of diseases and modulation of organic responses, mainly, related to stress, causing imbalance organic that impairing reproduction. This study was carried out with the objective to verify the influence of the homeopathy in the fresh and frozen semen and in the testicular histology of Nile tilapia. There were used 320 males of Nile tilapia (*O. niloticus*), GIFT strain, with six months of age, with mean initial weight of 93.12 ± 2.95g and total length of 17.58 ± 1.12 cm randomly distribute into four treatments: 1) control; 2) addition of 2% of *Homeopatila 100*; 3) addition of 4% of *Homeopatila 100*; 4) addition of 6% of *Homeopatila 100*. A randomized complete design was used and the response variables were submitted to the procedure of the generalized linear models. It was observed that the electrical conductivity increased (P<0.05) with ration with different levels of *Homeopatila 100*, 0.855 ± 0.006 mS/cm in control, 0.862 ± 0.004 mS/cm with the addition of 2% of *Homeopatila 100*/kg of the ration, 0.868 ± 0.04 mS/cm with 4% of *Homeopatila 100*/kg of the ration and 0.874 ± 0.006 mS/cm with 6% of *Homeopatila 100*/kg of the ration. There was a tendency in reduction of serum levels of cortisol and testosterone with the experimental diets, with significance of P<0.18 and P<0.06, respectively. The cortisol levels were 7.06 ± 1.26, 5.53 ± 1.50, 4.34 ± 1.80, 3.40 ± 2.16 µg/dL, and testosterone were 530.65 ± 1.36, 337.08 ± 1.07, 214.11 ± 0.84, 136.01 ± 0.67 ng/dL with diet with 0, 2, 4 and 6% of *Homeopatila100*/kg of ration. The monocytes were reduced (P<0.07) with increased levels of homeopathic complex in the ration, being 4.69 ± 0.12, 4.15 ± 0.08, 3.66 ± 0.09 and 3.24 ± 0.15%. The gonadosomatic index increased (P<0.05), with addition of levels of the *Homeopatila 100* in the ration, being 0.39 ± 0.28, 0.50 ± 0.18, 0.64 ± 0.15 and 0.83 ± 0.22. The percentage of A spermatogonia increased (P<0.05) to the level of 4% of *Homeopatila 100*/kg of the ration, with 6.23 ± 1.83, 8.58 ± 2.15, 8.93 ± 2.19. It was concluded that

the addition of 6% of *Homeopatila 100* increased gonadosomatic index being recommended for reproducers of *O. niloticus*.

Key Words: cryopreservation, fish, homeopathy, leukocytes, stress

I – INTRODUÇÃO

A aquicultura brasileira é uma importante atividade econômica geradora de lucro para a economia regional e nacional (Valenti et al., 2000), além do potencial no suprimento da demanda populacional de proteína animal (Navarro et al., 2009).

Nos últimos anos, a demanda pela carne de peixe aumentou impulsionada pelo crescimento da população e pela tendência mundial da busca de alimentos saudáveis e indicados à saúde humana. (Andrade & Yasui, 2003; Crepaldi et al., 2006).

Tilápia é o nome comum atualmente utilizado para os gêneros de peixes da família Cichlidae, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*, sendo que este último gênero se tornou a segunda fonte alimentar de peixes de água doce do mundo e os peixes do gênero *Oreochromis* os mais importantes comercialmente na aquicultura mundial, com mais de 75 países produtores (Morrison et al., 2001).

Lupchinski Júnior (2007) mencionou que a tilapicultura foi, inicialmente, uma atividade de subsistência e se expandiu durante a segunda metade do século XX, geográfica e produtivamente. O autor destacou que a tilápia foi originalmente encontrada na África e Oriente Médio e foi introduzida na Ásia tropical na década de 1930, tendo expansão para a Europa, América do Norte e Latina, na década de 1950.

No Brasil, a tilápia foi introduzida em 1953, com a importação da *Tilapia rendalli* do Congo (Tavares-Dias & Moraes, 2003). Em 1971, o Departamento Nacional de Obras Contra Seca (DNOCS) introduziu tilápias do Nilo nos açudes do Nordeste, que posteriormente difundiu-se pelo Brasil todo (Ayroza, 2009). As linhagens comerciais brasileiras têm origens distintas, sendo a Bouake originária da Costa do Marfim e introduzida no Brasil em 1971 (Castagnolli, 1992), a Chitralada ou Tailandesa originária do Egito, desenvolvida no Japão, melhorada na Tailândia foi importada para o Brasil em 1996 (Zimmermann, 1999) e a GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia), resultado do programa de melhoramento genético de tilápias do Worldfish

Center, na Malásia (Gupta & Acosta, 2004), sendo importada pelo Centro de Pesquisa em Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá, em 2005 (Fülber et al., 2010).

A tilápia apresenta características desejáveis à comercialização como adaptabilidade às condições ambientais variáveis, alta rusticidade, tolerância aos baixos níveis de oxigênio dissolvidos na água, resistência às doenças, rápido crescimento, boa conversão alimentar, consumo de ração artificial desde a fase larval e a aceitação da sua carne e dos seus subprodutos no mercado (Moreira et al., 2001; Dias-Koberstein et al., 2007). Entretanto, em termos comportamentais, a tilápia estabelece uma hierarquia de dominância e de submissão, estabelecida por meio de confrontos entre indivíduos, em que os animais maiores geralmente são dominantes e os menores são submissos. O estabelecimento e a manutenção desta hierarquia provocam, tanto aos dominantes quanto aos submissos, uma situação de estresse, porém com maior intensidade aos submissos (Andrade et al., 2004), que no aparelho reprodutivo pode ser observado no desenvolvimento rápido das gônadas em maior número em machos dominantes do que em submissos (Castro, 2004).

A reprodução dos peixes é imprescindível para a cadeia do pescado e o sucesso reprodutivo dependente da ontogênese gonadal (Strüssmann & Nakamura, 2002). As gônadas são compostas por dois compartimentos: o intersticial que contém as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos e mastócitos, tecidos conjuntivos e células neurais, e o compartimento tubular que é delimitado por uma membrana basal e por células miódes peritubulares contendo o epitélio germinativo, composto pelas células germinativas em diversos estágios de desenvolvimento e pelas células de Sertoli (Koulish et al., 2002; Schulz et al., 2010). Em teleósteos, a espermatogênese se desenvolve em cistos localizados dentro dos túbulos seminíferos, sendo estes cistos formados quando as células de Sertoli se associam à espermatogônia A (Vilela et al., 2003). Apesar do arranjo cístico, a espermatogênese dos teleósteos é semelhante a dos mamíferos (Lacerda et al., 2006).

A função da célula de Sertoli, em peixes, ainda não está completamente elucidada, mas verificou-se a presença de mitocôndrias esféricas e depósitos lipídicos no citoplasma (Cruz-Landim et al., 2005). Porém, a sobrevivência das células germinativas e seu desenvolvimento durante a espermatogênese estão associados às células de Sertoli, formando unidades de células germinativas/Sertoli (Schulz & Miura, 2002), de modo que o número de células de Sertoli pode determinar a capacidade

espermatogênica de um testículo, além de ser um importante alvo para os sistemas reguladores de sinais da espermatogênese (Schulz et al., 2010).

As atividades e as funções das células de Sertoli e de Leydig podem estar associadas ao desenvolvimento das células germinativas durante a espermatogênese (Chung et al., 2010). As células de Leydig têm função esteroidogênica na maioria das espécies de peixes (Lo Nostro et al., 2004).

O tamanho das gônadas e a produção de sêmen de peixes, apesar da variabilidade sazonal, aumentam continuamente durante a maturidade, sugerindo que as células de Sertoli proliferam-se ativamente, em peixes, sexualmente maduros (Vilela et al., 2003).

O sêmen dos peixes é produzido pelas gônadas e pelos ductos espermáticos e consiste de espermatozoides e de plasma seminal que é constituído por minerais e pequenas quantidades de proteínas, carboidratos, fósforo orgânico, ácido lático e lipídeos, sendo identificado somente dois grupos de proteínas no plasma seminal, as lipoproteínas e as antiproteinases (Krol et al., 2006). Alguns componentes do plasma seminal não são secretados, mas podem ser originados de células espermáticas em decomposição, sendo os íons sódio, potássio e cloro predominantes no plasma seminal, e os íons cálcio e magnésio, além de contribuírem na composição iônica do plasma seminal, são importantes na regulação da motilidade espermática, assim como na osmolaridade do plasma seminal, além de seu efeito direto na ativação espermática (Mojica, 2004).

Os espermatozoides não apresentam motilidade espermática dentro das gônadas (Carneiro, 2007). A osmolaridade e a composição do plasma seminal previnem a motilidade espermática nos ductos espermáticos dos peixes, sendo que o fluido seminal não somente imobiliza o espermatozoide, mas também o protege (Alavi & Cosson, 2006). Mojica (2004) observou dois mecanismos que mantém os espermatozoides imóveis no fluído seminal, em peixes de água doce. O primeiro observado a manter os espermatozoides imóveis, principalmente, em salmões *Salmo salar*, é quando a concentração do íon de potássio se encontrar acima de 40 mM e, é ativado quando a concentração de potássio for menor do que 25 mM; o segundo mecanismo, presente na maioria das espécies, está baseado na diferença da osmolaridade do plasma seminal com a do meio ambiente. O autor destacou que a motilidade espermática, em espécies de água doce, é inibida quando a osmolaridade do ambiente é maior que a do plasma seminal, atingindo mais de 300 mOsm/kg e, é ativada quando a osmolaridade ambiental é menor que 200 mOsm/kg.

As variações na qualidade do sêmen de peixes são afetadas pela variabilidade genética, pelo local de colheita de sêmen, nas gônadas ou no poro genital, pela contaminação do sêmen com urina e pelo grau de maturidade dos espermatozoides durante a estação reprodutiva (Suquet et al., 2000).

O comportamento reprodutivo é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que é influenciado por fatores exógenos como a temperatura, o fotoperíodo, o pH, a salinidade e a pluviosidade e, por fatores endógenos que medeiam alterações hormonais, gonadais e morfológicas (Castro, 2004).

Os fatores exógenos são detectadas por receptores específicos, transmitidos ao hipotálamo, alterando a produção e liberação de hormônios, sendo o hipotálamo produtor do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) que estimula a liberação de gonadotropinas pela adeno-hipófise e estas são as responsáveis pela maturação das gônadas e liberação de esteroides gonadais (Baldisserotto, 2002). Entretanto, Lima et al. (2006) destacaram que o cortisol é o indicador de estresse mais utilizado em peixes, em qualquer fase fisiológica, sendo que altos teores plasmáticos indicam supressão das funções reprodutivas e imunológicas. Os referidos autores relataram que o cortisol plasmático, nas diferentes espécies de peixes, é elevado minutos após a ação de um estressor agudo moderado, atingindo um pico e retornam aos teores basais após um período aproximado de 6h.

O cortisol é sintetizado pelas células interrenais que são homólogas às células do córtex das adrenais (Harris & Bird, 2000). As concentrações deste hormônio aumentam durante a estação reprodutiva de algumas espécies de peixes, porém em condições estressantes as altas concentrações podem reduzir o tamanho das gônadas, retardar a espermatogênese e prejudicar a qualidade do sêmen (Milla et al., 2009).

O sistema imune é essencial para a homeostase do organismo constituindo um complexo mecanismo de defesa que é dividido em imunidade não específica ou inata e específica ou adaptativa (Bowden, 2008). A imunidade não específica é o mecanismo mais importante para resistência dos peixes, pois os altos teores de cortisol liberados durante o estresse produzem alterações nas atividades fagocitárias, na atividade da lisoenzima, na atividade sorológica hemolítica e aglutinante (Montero et al., 1999; Teixeira et al., 2011).

O sistema imune e o sistema endócrino comunicam-se e cooperam entre si para a manutenção da homeostasia do organismo (Harris & Bird, 2000). Desta maneira, comunicações bidirecionais incluem a regulação das funções do sistema endócrino por

meio de moléculas sinalizadoras derivadas do sistema imune e a regulação das funções do sistema imune por meio de moléculas sinalizadoras do sistema endócrino (Weyts et al., 1999). Os efeitos do estresse no sistema imune de peixes reduzem a concentração sorológica de imunoglobulina M, enquanto os impactos ambientais influenciam o sistema endócrino (Bowden, 2008).

A hematologia é importante para a manutenção da homeostase do organismo, visto que a avaliação dos componentes sanguíneos auxilia a determinação de condições patológicas e o aumento do número de leucócitos pode indicar resposta de defesa do organismo (Azevedo et al., 2006).

De acordo com Davis et al. (2008), a maioria dos vertebrados apresenta cinco tipos de leucócitos: linfócitos, netrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos, sendo a morfologia destas células preservadas, exceto os neutrófilos, que em aves e répteis são substituídos por heterofilos que executam funções imunológicas semelhantes. Os autores relataram que em condições estressantes os neutrófilos/heterófilos aumentam na circulação sanguínea, enquanto o número de linfócitos é reduzido, o que influencia diretamente os teores dos hormônios relacionados ao estresse.

O estresse é um estado orgânico, produzido por fatores ambientais, físicos e biológicos que causam desajustes fisiológicos e bioquímicos no organismo e os efeitos imediatos do estresse estão relacionados à variação na concentração plasmática de cortisol, de glicose e do perfil hematológico (Vargas & Ribeiro, 2009). As respostas fisiológicas do estresse são classificadas em primárias, secundárias e terciárias, sendo as primárias caracterizadas pelo aumento plasmático das catecolaminas e dos corticosteroides, as secundárias pelos parâmetros metabólicos, hematológicos, imunológicos e hidrominerais e as terciárias envolvem o crescimento animal, taxa metabólica, resistência as doenças, tolerância térmica, resistência a hipóxia e a capacidade reprodutiva (Cnaani et al., 2004). O estresse, em peixes, é descrito como distúrbio do equilíbrio interno, com alteração da homeostase, tornando os peixes mais susceptíveis às doenças pela imunossupressão (El-Sayed, 2006).

Em condições estressantes, as espécies de oxigênios reativos são aumentadas comprometendo a qualidade do sêmen, visto que as membranas plasmáticas dos espermatozoides são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, tornando-as muito fluidas e susceptíveis aos danos peroxidativos, que determinam a perda de suas funções e da integridade do DNA (Guerra et al., 2004).

A criobiologia reprodutiva iniciou-se em 1949 com a descoberta do glicerol como potente crioprotetor, que foi, posteriomente, testado com sucesso na criopreservação de sêmen de mamíferos (Petrunkina, 2007). A criopreservação é um processo pelo qual células e tecidos são preservados por congelamento em temperaturas baixas, comumente, a - 196˚C, em nitrogênio líquido (Tiersch, 2008).

A criopreservação de espermatozoides de tilápias é fundamental para conservação de seus recursos genéticos (Godinho et al., 2003). A conservação de sêmen por longos períodos pode ser utilizada para preservar genes para o aumento da variabilidade genética de uma determinada população, pois uma população natural de peixes depende da alta variabilidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio ambiente e, um plantel de reprodutores precisa desta variabilidade para reduzir os efeitos negativos dos endocruzamentos e das homozigoses (Carneiro, 2007).

A preservação de gametas também é considerada importante biotecnologia para laboratórios de produção de alevinos, pela economia na manutenção dos reprodutores e prevenção de perdas de linhagens geneticamente melhoradas (Mojica, 2004).

Embora a técnica de criopreservação seja fundamental na zootecnia, o processo induz ao estresse térmico e osmótico dos espermatozoides, resultando em perda da integridade da membrana plasmática, com consequente redução da motilidade espermática e perda da viabilidade dos espermatozoides (Giraud et al., 2000). O congelamento de tecido ou célula inicia-se externamente, pela formação de gelo, sendo paralelamente formadas regiões com elevada concentração de soluto que originarão a exosmose e desidratação celular (Carneiro, 2007). Sendo assim, o ritmo inadequado de congelamento pode formar cristais de gelo intracelulares, responsáveis por injúrias celulares irreversíveis (Petrunkina, 2007).

O sucesso da criopreservação depende da resistência da célula espermática às baixas temperaturas (Chatterjee & Gagnon, 2001) e da utilização de soluções crioprotetoras adequadas (Menezes et al., 2008), que são essenciais para prevenção de danos celulares (Bamba & Adams, 1990). Godinho et al. (2003) relataram que as soluções crioprotetoras contendo dimetilsulfóxido (DMSO) são utilizadas, com sucesso, em diferentes espécies de peixes. Entretanto, os autores enfatizaram que o metanol é considerado o crioprotetor mais adequado para a criopreservação de sêmen de tilápias, porém, em seu estudo, os mesmos não observaram diferença entre o metanol e o DMSO na motilidade espermática pós-descongelamento. Os autores ressaltaram que a eficiência crioprotetora pode aumentar, quando são combinados um crioprotetor interno

com um externo como, por exemplo, metanol e leite em pó ou DMSO e gema de ovo, respectivamente.

A criopreservação aumenta a susceptibilidade do espermatozoide aos diferentes tipos de oxigênios reativos, reduzindo irreversivelmente a motilidade espermática progressiva, prejudicando a integridade morfológica e a capacidade fecundante dos espermatozoides (Guerra et al., 2004). O processo de descongelação também é causador de danos na membrana plasmática, decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pelos espermatozoides e da rápida transição da fase sólida para líquida da membrana plasmática, gerando maior produção de diferentes tipos de oxigênios reativos (Chatterjee & Gagnon, 2001).

A viabilidade do sêmen mensurada antes, durante e depois do processo de armazenamento, tem sido base para desenvolvimento de novos métodos de pesquisa de preservação de sêmen (Saacke, 1983).

A homeopatia é um método terapêutico, desenvolvido no final do século XVIII pelo físico alemão Samuel Hahnemann (Arenales, 2002). Ela foi, a princípio, utilizada no tratamento de moléstias humanas e, posteriormente, testada no tratamento de espécies animais (Souza, 2002).

Em comparação à homeopatia humana, poucos estudos têm sido publicados sobre a homeopatia veterinária, sendo estes conduzidos, principalmente, com bovinos, suínos e aves visando redução de custo de produção e aumento da produtividade (Clausen & Albrech, 2010).

A homeopatia é baseada no princípio dos semelhantes e na utilização de medicamentos que retém atividade biológica, após repetidas diluições e sucussões até mesmo quando a diluição ultrapassa o número do Avogadro, que é o limite da divisibilidade da matéria (Ernst, 2002). A princípio, a utilização de medicamentos diluídos surgiu visando evitar as agravações e as intoxicações observadas na utilização de doses maiores, segundo o princípio da semelhança curativa (Teixeira, 2009).

A ausência de moléculas de princípio ativo poderia excluir a sua ação direta. Porém, as propriedades físico-quimicas de soluções extremamente diluídas são diferentes da água pura não-tratada, apesar da composição química ser a mesma nos dois líquidos, sendo também que a estrutura das pontes de hidrogênio da água pura é diferente de soluções extremamente diluídas obtidas pelas sucessivas diluições e sucussões (Elia et al., 2004).

Jütte & Riley (2005) relataram que mesmo que não haja um consenso formal na utilização de altas ou baixas potências nas diluições, as altas potências são preferíveis no tratamento de sintomas psicológicos, enquanto baixas potências são utilizadas em sintomas físicos e/ou orgânicos. Os autores ressaltaram que altas potências devem ser repetidas com menor frequência, enquanto baixas potências podem ser repetidas com maior frequência, sendo utilizadas em casos agudos e muitas vezes utilizadas em conjunto com medicamentos convencionais. Além disto, os autores destacaram que baixas potências podem facilitar a resposta do mesmo medicamento em altas potências, sendo a atividade biológica verificada nas diferentes potências.

Os medicamentos homeopáticos podem ser elaborados de matérias-primas de origem vegetal, animal e mineral, as quais são solubilizadas em água ou em álcool (Aziz & Enbergs, 2005; Vargas & Ribeiro, 2009). Apesar dos questionamentos da comunidade científica à terapia homeopática tem resistido ao teste do tempo, sendo utilizada em vários países (Chikramane et al., 2010).

O estímulo da energia vital do organismo pelo tratamento homeopático pode ser utilizado na profilaxia, no tratamento de doenças e na modulação de respostas orgânicas, principalmente, relacionadas ao estresse (Valentim-Zabott et al., 2008). Matos (2009) relatou que a energia vital é o alvo do tratamento homeopático que atua pela ação da energia física dos elétrons, contidos no medicamento homeopático, objetivando o equilíbrio vital em desarmonia, que é representada pela doença. O autor ressaltou que a presença destes elétrons em medicamento homeopático pode ser detectada através de métodos físicos, como a análise do espectro capilar, análise espectral infravermelha, análise microlimétrica, leitura de condutância, ressonância magnética, detector Gay, cristalizadores de Pfeiffer e outros. De acordo com o autor, a liberação da energia dinâmica no preparo do medicamento homeopático, processo denominado de dinamização, ocorre por meio da vibração molecular, pela agitação ritmada contra anteparo apropriado, utilizando sucussão nas formas líquidas ou trituração nas formas sólidas.

A homeopatia prioriza a tratamento individual, sendo o tratamento populacional também considerado unitário, com suas particularidades raciais, temperamentais, ambientais e outras (Souza, 2002). Os medicamentos homeopáticos, quando adicionados à água ou à ração não interferem na palatabilidade, além de não deixarem resíduos no organismo animal e no meio ambiente (Arenales, 2002). A alopatia pode ser efetiva, porém de difícil utilização na piscicultura, visto que a maioria dos produtos é

nocivo aos peixes à população consumidora e ao meio ambiente (Vargas, 2004), além de aumentarem a resistência dos patógenos aos medicamentos (Verlhac & Gabaudan, 1994).

Baseado no exposto, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da homeopatia na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de tilápias do Nilo.

Referências

ALAVI, S.M.H; COSSON, J. Sperm motility in fishes. Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, v.30, n.1, p.1-14, 2006.

ANDRADE, L.S.; HAYASHI, C.; SOUZA, S.R. Efeito da cor e da presença de refúgio artificial sobre o desenvolvimento e sobrevivência de alevinos de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.26, n.1, p.61-66, 2004.

ANDRADE,D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.166-172, 2003.

ARENALES, M.C. Homeopatia em gado de corte. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1., 2002, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

AYROZA, L.M.S. **Criação de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR**. 2009. 104f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo.

AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M. et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, n.1, p.41-49, 2006.

AZIZ, D.M.; ENBERGS, H. Stimulation of bovine sperm mitochondrial activity by homeopathic dilutions of monensin. **Homeopathy**, v.94, n.4, p.229-232, 2005.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora UFSM, 2002. 212p.

BAMBA, K.; ADAMS, C. E. Freezing rabbit semen by use of BF5 diluent. **Laboratory Animals**, v.24, n.2, p. 172-175, 1990.

BOWDEN, T.J. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, n.4, p.373-383, 2008.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.13, p.361-366, 2007.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep, 1992. 189p.

CASTRO, A.L.S. **Efeito dos estímulos visuais e químicos do sexo oposto na reprodução de tilápia-do-Nilo**. 2004. 40f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, n.4, p.451-458, 2001.

CHIKRAMANE, P.S.; SURESH, A.K.; BELLARE, J.R. et al. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. **Homeopathy**, v.99, n.4, p.231-242, 2010.

CHUNG, E.Y; YANG, Y.C.; KANG, H.W. et al. Ultrastructure of germ cells and the functions of Leydig cells and Sertoli cells associated with spermatogenesis in Pampus argenteus (Teleostei: Perciformes: Stromateidae). **Zoological Studies**, v.49, n.1, p.39-50, 2010.

CLAUSEN, J.; ALBRECH, H. Database on veterinary clinical research in homeopathy. **Homeopathy**, v.99, n.3, p.189-191, 2010.

CNAANI, A.; TINMAN, S.; AVIDAR, Y. et al. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. **Aquaculture Research**, v.35, n.15, p.1434-1440, 2004.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A. et al. A situação da Aquacultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.81-85, 2006.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Morphological changes of Sertoli cels during the male reproductive cicle of teleost *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v.65, n.2, p.241-249, 2005.

DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERS, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v.22, n.5, p.760-772, 2008.

DIAS-KOBERSTEIN, T.C.R; GABRIEL NETO, A.; STÉFANI, M.V. et al. Reversão sexual de larvas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais. **Revista Acadêmica**, n.5, n.4, p.391-395, 2007.

ELIA, V.; BAIANO, S.; DURO, I. et al. Permanent physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions of homeopathic medicines. **Homeopathy**, v.93, n.3, p.144-150, 2004.

EL-SAYED, A.F.M. **Tilapia culture**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. 277p.

ERNST, R. A systematic review of systematic reviews of homeopathy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.54, n.6, p.577-582, 2002.

FÜLBER, V.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.D. et al. Desempenho produtivo de três linhagens de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dois níveis de proteína. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.32, n.1, p.77-83, 2010.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, n.10, p.2160-2164, 2000.

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 de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1537-1543, 2003.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.4, p.87-195, 2004.

GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project**. NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v.27, n.3/4, p.4-14, 2004.

HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.77, n.3, p.163-176, 2000.

JÜTTE, R.; RILEY, D. A review of the use and role of low potencies in homeopathy. **Complementary Therapies in Medicine**, v.13, n.4, p.291-296, 2005.

KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H.J. Organization of the male gonad in a Protogynous Fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v.254, n.3, p.292-311, 2002.

KROL, J.; GLOGOWSKI, J.; DEMSKA-ZAKES, K. et al. Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during spawning period. **Czech Journal of Animal Science**, v.51, n.5, p.220-226, 2006.

LACERDA, S.M.S.N.; BATLOUNI, S.R.; SILVA, S.B.G. et al. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Animal Reproduction**, v.3, n.2, p.146-159, 2006.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.113-117, 2006.

LO NOSTRO, F.L.; ANTONELI, F.N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. et al. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). **Tissue and Cell**, v.36, n.4, p.221-231, 2004.

LUPCHINSKI JR., E. **Avaliação da composição genética de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e das gerações g_0e f_1 da linhagem GIFT**. 2007. 76f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

MATOS, R.M.A. **A produção do conhecimento em homeopatia e seu ensino nas faculdades de medicina das Universidades Federais Brasileiras.** 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências e Saúde) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MENEZES, J.T.B.; QUEIROZ, L.J.; DORIA, C.R.C. et al. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazônica,** v.38, n.2, p.365-368, 2008.

MILLA, S.; WANG, N.; MANDIKI, S.M.N. et al. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.153, n.3, p.242-251, 2009.

MOJICA, C.A.P. **Análise ultraestrutural e avaliação de peixes neotropicais *Brycon orbignyanus, Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei).** 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

MONTERO, D.; IZQUIERDO, M.S.; TORT, L. et al. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. **Fish Physiology and Bio-chemistry,** v.20, n.1, p.53-60, 1999.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. 200p.

MORRISON, C.M.; MIYAKE, T.; WRIGHT, J. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Journal of Morphology**, v.247, n.2, p.172-195, 2001.

NAVARRRO, R.D.; RIBEIRO FILHO, O.P.R.; FERREIRA, W.M. et al. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.1, p.20-25, 2009.

PETRUNKINA, A.M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie**, v.4, n.2, p.78-91, 2007.

SAACKE, R.G. Semen quality in relation to semen preservation. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.12, p.2635-2644, 1983.

SCHULS, R.W.; FRANÇA, L.R.; LAREYRE, J. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, n.3, p.390-411, 2010.

SCHULS, R.W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Bio-chemistry**, v.26, n.1, p.43-56, 2002.

SOUZA, M.F.A. Homeopatia veterinária. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1., 2002, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

STRÜSSMANN, C.A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Bio-chemistry**, v.26, n.1, p.13-29, 2002.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v.31, n.3, p.231-243, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.107-114, 2003.

TEIXEIRA, M.Z. **Ensaio clínico quali-quantitativo para avaliar a eficácia e a efetividade do tratamento homeopático individualizado na renite alérgica perene.** 2009. 315f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

TEIXEIRA, C.P.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. et al. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. **Aquaculture Research**, v.32, n.1, p.1-8, 2011.

TIERSCH, T.R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.1, p.15-19, 2008.

VALENTI, W.C.; POLLI, C.R.; PEREIRA, J. A. et al. **Aqüicultura no Brasil**: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília, DF: CNPQ/ Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399p.

VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. Effects of homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. **Homeopathy**, v.97, n.4, p.190-195, 2008.

VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa, 2009. v. 1, p. 106-131.

VARGAS, L. Efeito da vitamina C, da vitamina E, do cloreto de sódio e da formalina na ocorrência de ectoparasitos em tilápias do Nilo. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. p.371-382.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Saint-Louis Cedex, France: Société Chimique Roche. 1994. 29p.

VILELA, D.A.R.; PEIXOTO, M.T.D; GODINHO, H.P. et al. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Bio-chemistry**, v.28, n.2, p.187-190, 2003.

WEYTS, F.A.A.; COHEN, N.; FLIK, G. et al. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.9, n.1, p.1-20, 1999.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilapias-do-nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aqüicultura**, v.9, n.54, p.15-21, 1999.

II – *Homeopatila 100* na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO - Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da homeopatia na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de tilápias do Nilo. Foram utilizados 320 machos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), da linhagem GIFT, distribuídos, aleatoriamente, em tratamentos com 0, 2, 4 e 6% *Homeopatila 100*/kg de ração. Verificou-se a tendência na redução dos teores sorológicos de cortisol e testosterona com as dietas experimentais, com significância de (P<0,18) e (P<0,06), respectivamente. Os teores de cortisol foram 7,06 ± 1,26; 5,53 ± 1,50; 4,34 ± 1,80; 3,40 ± 2,16 µg/dL e os de testosterona foram 530,65 ± 1,36; 337,08 ± 1,07; 214,11 ± 0,84; 136,01 ± 0,67 ng/dL com alimentação com 0, 2, 4 e 6% de *Homeopatila 100*/kg de ração. Os monócitos foram reduzidos (P<0,07) com o aumento dos teores de núcleo homeopático na dieta, sendo 4,69 ± 0,12; 4,15 ± 0,08; 3,66 ± 0,09; 3,24 ± 0,15%, respectivamente, nos grupos com 0, 2, 4 e 6% de *Homeopatila 100*/kg de ração. O índice gonadossomático aumentou (P<0,05), com a ração com teores de *Homeopatila 100* na dieta, sendo 0,39 ± 0,28, no controle; 0,50 ± 0,18, com 2%; 0,64 ± 0,15, com 4% e 0,83 ± 0,22 com 6% de *Homeopatila 100* kg de ração. O percentual de espermatogônias A aumentou (P<0,05) até o teor de 4% de *Homeopatila 100*/kg de ração, com 6,23 ± 1,83; 8,58 ± 2,15; 8,93 ± 2,19. Conclui-se que a adição de 6% *Homeopatila 100* aumentou o índice gonadossomático sendo recomendada para reprodutores de *O. niloticus*.

Palavras-chave: criopreservação, estresse, homeopatia, leucócitos, peixe

Homeopatila 100 in fresh or frozen semen and in testicular histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT - This study was carried out with the objective to verify the influence of the homeopathy in fresh and frozen semen and in testicular histology of Nile tilapia. There were used 320 male Nile tilapia (*O. niloticus*), of the GIFT strain, randomly distributed in four treatments with 0, 2, 4 and 6% *Homeopatila 100*/kg of ration. There was a tendency in reduction of serum levels of cortisol and testosterone with the experimental diets, with significance of ($P<0.18$ and $P<0.06$, respectively. The cortisol levels were 7.06 ± 1.26, 5.53 ± 1.50, 4.34 ± 1.80, 3.40 ± 2.16 µg/dL, and testosterone were 530.65 ± 1.36, 337.08 ± 1.07, 214.11 ± 0.84, 136.01 ± 0.67 ng/dL with diet with 0, 2, 4 and 6% of *Homeopatila100*/ kg of ration. The monocytes were reduced ($P<0.07$) with increased levels of homeopathic complex in ration, being 4.69 ± 0.12, 4.15 ± 0.08, 3.66 ± 0.09 and 3.24 ± 0.15%, respectively, in groups with 0, 2, 4 and 6% of Homeopatila 100/kg of ration. The gonadosomatic index increased ($P<0.05$), with addition of levels of the *Homeopatila 100* in the ration, being 0.39 ± 0.28, 0.50 ± 0.18, 0.64 ± 0.15 and 0.83 ± 0.22, in order to control group, 2, 4 and 6% of *Homeopatila 100*/kg of ration. The percentage of A spermatogonia increased ($P<0.05$) up to 4% of *Homeopatila 100*/kg of the ration, with 6.23 ± 1.83, 8.58 ± 2.15, 8.93 ± 2.19. It was concluded that the addition of 6% of *Homeopatila 100* increased gonadosomatic being recommended for reproducers of *O. niloticus*.

Key Words: cryopreservation, fish, homeopathy, leukocytes, stress

Introdução

O estresse gerado pelo cultivo intensivo de peixes pode prejudicar o desempenho reprodutivo e dependendo do estágio de maturação gonadal, inibir a atividade da hipófise, reduzindo os teores de gonadotropinas e, consequentemente, dos hormônios esteroides (Lima et al., 2006). O cortisol é o indicador mais utilizado de estresse em peixes, em qualquer fase fisiológica e altos teores plasmáticos indicam supressão das funções imunológicas e reprodutivas (Vargas & Ribeiro, 2009). Guerra et al. (2004) ressaltaram que o estresse aumenta a produção de diferentes tipos de oxigênio reativos, comprometendo, também, a qualidade do sêmen. Isto impossibilita seu congelamento, visto que as membranas plasmáticas dos espermatozoides são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, tornando-as muito fluidas e susceptíveis aos danos peroxidativos, que determinam a perda de suas funções e da integridade do DNA.

A homeopatia estimula a energia vital do organismo, permitindo a profilaxia, tratamento de doenças e a modulação de respostas orgânicas, principalmente, relacionadas ao estresse (Valentim-Zabott et al., 2008). Os princípios da homeopatia indicam que a toxicidade ou agentes inibitórios derivados de plantas, animais e minerais, tornam-se estimuladores ou protetores, quando utilizados em altas diluições (Aziz & Enbergs, 2005; Vargas & Ribeiro, 2009).

Ros et al. (2006) relataram que pelo receptor específico de andrógenos nos leucócitos é possível a regulação da imunocompetência de salmonídeos, sendo que teores elevados de testosterona no período reprodutivo suprimem a imunocompetência e causam mortalidades. Valentim-Zabott (2006) ressaltou que em lotes monossexo de tilápias do Nilo, dificilmente, há desenvolvimento gonadal completo, sendo a energia destinada ao crescimento das gônadas direcionadas ao crescimento corporal. Contudo, a homeopatia estimula o sistema imunológico, favorecendo o restabelecimento do equilíbrio animal e a redução do estresse (Benites, 2002; Servais, 2003). Desta maneira, é possível que os teores de núcleo homeopático, utilizados neste estudo, proporcionem equilíbrio fisiológico, resultando em desenvolvimento gonadal completo e melhoria na qualidade do sêmen fresco e congelado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da homeopatia na qualidade do sêmen fresco ou congelado e na histologia testicular de O. niloticus.

Material e Métodos

O experimento, aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM, foi realizado na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (Codapar/UEM), distrito de Floriano, Maringá, latitude 23°31'25"S e longitude 52°03'12"W, e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, durante 90 dias entre os meses de março a maio de 2010.

Foram utilizados 320 machos de *O. niloticus*, linhagem GIFT, com seis meses de idade, peso médio inicial de 93,12 ± 2,95 g e comprimento total de 17,58 ± 1,12 cm, distribuídos, aleatoriamente, em quatro tratamentos, com quatro repetições, sendo cada caixa de fibra de vidro, uma unidade experimental, com 20 peixes cada.

Os peixes foram alocados em estufa, com cobertura superior de tela sombrite 50% e laterais de lona plástica, para proteção contra variações climáticas bruscas e predadores. A água era renovada diariamente em 30% e o sistema suprido com aeração constante acima de 5 mg de oxigênio/L. Para a remoção do acúmulo de matéria orgânica, as caixas de fibra de vidro eram sifonadas três vezes por semana, com substituição de 70% da água.

Após a implantação do experimento, três vezes na semana, foram aferidas as medidas de temperatura da água com termômetro Incoterm comum e, semanalmente, foram medidos o pH com phmêtro portátil Máster F-1002, o oxigênio dissolvido com oxímetro F-050 e a condutividade elétrica com o condutivímetro modelo DC-860.

Os peixes foram alimentados três vezes por dia (3% da biomassa) com ração extrusada comercial com 45% de proteína bruta. Posteriormente, ao atingirem peso médio de 150 g, os peixes foram alimentados com ração contendo 32% de proteína bruta.

Foram avaliados o controle e três teores de *Homeopatila 100* (Laboratório Veterinário Real H, Cadastro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sob o N° 024/001 SFA/MS): 1) Controle; 2) com 2% de *Homeopatila 100*; 3) com 4% *Homeopatila 100*; e 4) com 6% *Homeopatila 100*. As dietas com os tratamentos foram preparadas semanalmente, aspergindo 20 mL solução hidroalcoólica (álcool 30° GL)/kg de dieta – no grupo controle, 20 mL/kg de dieta de *Homeopatila 100* para 2%, 40 mL de *Homeopatila* 100/kg de dieta para 4% e 60 mL de *Homeopatila* 100/kg de dieta para 6%, homogeneizando-se, inicialmente, e deixando-a secar, revolvendo, periodicamente,

ao abrigo da luz solar ou de produtos químicos, até apresentar-se solta e sem odor de álcool (Merlini, 2006).

Tabela 1 - Composição e diluição do núcleo homeopático *Homeopatila 100*, por quilo de produto

Composição do produto	Diluição
Iodum	10^{-24}
Sulphur	10^{-60}
Natrum muriaticum	10^{-400}
Streptococcinum	10^{-60}
Veículo (Álcool etílico 30 GL)	1 litro

Aos 90 dias do fornecimento das dietas experimentais foram realizadas as colheitas de sangue, retirada de gônadas e avaliação do sêmen de 20 peixes por tratamento.

O sangue (0,5 mL) foi retirado de cada peixe por punção vaso caudal (Tavares-dias & Moraes, 2003) e, em seguida, realizadas as extensões sanguíneas em lâminas, as quais foram coradas, segundo método de Rosenfeld (1947) e empregadas na contagem de células sanguíneas de defesa. O restante do sangue foi utilizado para as dosagens sorológicas de cortisol e de testosterona, realizadas pelo método de quimioluminescência no Centro de Diagnóstico Veterinário, em Maringá, Paraná.

Para obtenção dos dados biométricos e para a retirada das gônadas, os peixes foram anestesiados com Benzocaína. O índice gonadossomático (IGS) foi expresso pela relação: IGS = Pg/ Pt x 100, em que: Pg = peso das gônadas (g); Pt = peso total (g) (Soares et al., 2003; Castro, 2004).

Para análise histológica, as amostras foram retiradas da parte intermediária das gônadas esquerdas, acondicionadas em solução de Bouim, desidratadas, diafanizadas e, emblocados em parafina, para a obtenção dos cortes em micrótomo Leica manual, em espessuras de 5 µm. As lâminas foram coradas com hematoxilina (Dziewulska & Domagala, 2003), e eosina sendo, posteriormente, fotografadas em microscópio Motic BA400, com câmera Moticam 2.500. As áreas foram delimitadas com o auxílio do Software Motic Images Plus 2.0. Para aferição da espessura média do parênquima testicular foram confeccionadas três lâminas por peixe, sendo tiradas três fotomicrografias por lâmina, em aumento de 40x, com barra de escala de 10 µm, para

realização de 21 medidas por lâmina e total de 63 medidas por peixe. Para diferenciação dos tipos de células espermáticas foram confeccionadas três lâminas de cada peixe, sendo tiradas 12 fotomicrografias em aumento de 40x, com barra de escala de 10 µm, por lâmina e total 36 fotomicrografias por peixe. A área de cada fotomicrografia no aumento de 40x foi 60.562,8 µm².

Para a colheita de sêmen, a papila urogenital foi seca com toalha de papel para reduzir o risco de contaminação do sêmen (Godinho et al., 2003). O sêmen foi coletado em seringas de insulina, devidamente identificadas.

Do sêmen colhido de cada tilápia do Nilo foram avaliados: cor, volume, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, pH, concentração e a morfologia espermática, segundo os procedimentos de Sörensen (1979), adaptados para peixes, descritos como segue:

Volume: após massagem na região abdominal no sentido encéfalo-caudal até esgotar a liberação do sêmen, graduou-se e registrou-se o volume coletado.

Concentração espermática: diluiu-se em um bécker 0,01 mL (micropipeta de 10 µL) em 10 mL de formol-salina tamponada, resultando a diluição de 1:500. Após a diluição, a câmara de Neubauer foi preenchida, por capilaridade e, foram contados os espermatozoides de cinco quadrados maiores do campo de 1 mm². Os espermatozoides contados nos referidos quadrados foram somados, divididos por 80 quadrados pequenos, multiplicados por 400 quadrados pequenos, pela diluição e pela altura da câmara, para se obter a quantidade de espermatozoides por mm³ de sêmen.

Motilidade espermática progressiva e vigor espermático: em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída uma gota de sêmen em seis a oito gotas de bicarbonato de sódio a 1% e, deste diluído, foi colocado uma gota (0,03 mL – pipeta de Pasteur) sobre outra lâmina e sobre a gota foi colocada uma lamínula e levada ao microscópio de contraste de fase em aumento de 400x e avaliadas, subjetivamente, ambas variáveis. Para motilidade espermática progressiva e vigor espermático, o escore variou de 0 a 100% e 0 a 5 pontos, respectivamente.

pH: foi utilizado papel de tornassol, colocando uma gota de sêmen sobre a fita, efetuando a leitura em escala própria.

Cor: foi utilizado o escore de 1 a 3 pontos, sendo que um (1) representa a coloração branco cremoso, dois (2) branco leitoso, três (3) branco aquoso.

Morfologia espermática: foram preparados dois esfregaços com sêmen diluído em formol-salina tamponada, na proporção de 1:500 (sêmen/solução diluente,

respectivamente). Os esfregaços foram secos ao ar livre, corados pelo método de Williams (1920), modificado por Lagerlöf (1934) e, posteriormente, avaliados em objetiva de 100x. Foram consideradas anormalidades primárias cauda quebrada, enrolada, degenerada, macrocefalia, microcefalia e inserção abaxial de cauda e, anormalidades secundárias, cauda dobrada, cabeça solta, gotas citoplasmáticas proximal e distal, realizando a contagem de 100 espermatozoides entre as lâminas feitas de cada animal.

Com os valores dos volumes individuais e da concentração espermática foi calculado o número total de espermatozoides.

Para o congelamento, o sêmen foi misturado ao meio diluidor na proporção 1:9. A composição do meio diluidor é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio diluidor, com crioprotetor, para congelamento de sêmen de tilápias do Nilo

Componentes	Quantidade
Beltsville Thawing Solution	5,00 g
Citrato de sódio diidratado	0,64 g
Glicose mono-hidratada	4,00 g
Ácido etilenodiamino tetra-acético	0,13 g
Penicilina G sódica	0,03 g
Bicarbonato de sódio	0,13 g
Cloreto de potássio	0,08 g
Água Destilada	100 mL
Dimetilsulfóxido	10 mL

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, transferidas para um botijão de vapor de nitrogênio líquido (*dry shipper*) e mantidas em posição vertical. Após 24h, as palhetas foram transferidas para um botijão de armazenamento, a -196°C. Em junho de 2010, as palhetas foram descongeladas, em banho-maria, a 30°C, durante 8 segundos, para avaliação da motilidade espermática progressiva, vigor espermático, morfologia espermática e do tempo de sobrevivência do espermatozoide pós-descongelamento.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualisado e as variáveis resposta foram submetidas ao procedimento dos Modelos Lineares Generalizados (Dobson, 2002), utilizando o procedimento GENMOD do SAS (1992), considerando que os erros possuíam diferentes distribuições de probabilidade, com função de ligação canônica.

Resultados e Discussão

Os parâmetros físicos químicos da água durante o período experimental não foram diferentes (P>0,05) entre as unidades experimentais, exceto a condutividade elétrica. A temperatura média da água foi 22,60 ± 0,10°C, de acordo com o recomendado por Moreira et al. (2001), que destacaram como temperatura ótima de desenvolvimento desta espécie o intervalo de 20 a 30°C. O valor médio do pH da água foi 7,46 ± 0,03, considerado adequado para o crescimento de tilápias, de acordo com Bombardelli et al. (2010). A concentração média de oxigênio dissolvido foi de 3,48 ± 0,20 mg/L. Apesar deste valor não ser o ideal para cultivo de tilápias (El-Sayed, 2006), ele foi satisfatório para a manutenção do crescimento da espécie.

A condutividade elétrica aumentou (P<0,05), linearmente à medida que os teores de *Homeopatila 100* foram acrescidos na ração de tilápias do Nilo, sendo de 0,855 ± 0,006 µS/cm no controle, 0,862 ± 0,004 µS/cm com adição de 2% de *Homeopatila 100*/kg de ração, 0,868 ± 0,04 µS/cm com 4% *Homeopatila 100*/kg de ração e 0,874 ± 0,006 µS/cm com 6% *Homeopatila 100/*kg de ração. A condutividade elétrica é habilidade de uma solução aquosa conduzir corrente elétrica pela presença de íons (Fülber et al., 2010). Desta maneira, considerando as condições de manejo similares nas unidades experimentais, é possível que o aumento linear da condutividade elétrica esteja relacionado com a homeopatia, visto que a energia vital é o alvo do tratamento homeopático que atua pela ação da energia física dos elétrons contidos no medicamento homeopático, objetivando o equilíbrio do organismo (Valentim-Zabott et al., 2008; Matos, 2009). Chikramane et al. (2010), utilizando amostras derivadas de metal, detectaram por meio da microscopia eletrônica de transmissão, da difração eletrônica e de análises químicas de espectroscopia de emissão atômica, a presença de entidades físicas dos metais de origem em extremas diluições, na forma de nanopartículas.

O consumo semanal de ração pelos peixes não foi influenciado (P>0,05) pelos teores de *Homeopatila 100*, com média estimada e erro-padrão de 442,31 ± 1,11 g, por unidade experimental.

Os teores de cortisol e testosterona no soro de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100*, foram reduzidos (P<0,18) e (P<0,06), respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Média estimada e erro-padrão dos teores de cortisol e de testosterona e no soro de tilápias do Nilo, alimentadas com *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), durante 90 dias

Parâmetros	Teor de *Homeopatila 100*/kg de ração				Pr<ChiSq
	Controle	2%	4%	6%	
Cortisol (µg/dL)	7,06 ± 1,26	5,53 ± 1,50	4,34 ± 1,80	3,40 ± 2,16	0,18
Testosterona (ng/dL)	530,65 ± 1,36	337,08 ± 1,07	214,11 ± 0,84	136,01 ± 0,67	0,06

Os teores sorológicos de cortisol (Tabela 3) foram reduzidos (P<0,18), $y = \exp^{1,9537 - 0,1215x}$, com alimentação com teores de *Homeopatila 100*. Esta tendência foi destacada considerando a atuação da homeopatia em 82% dos peixes deste estudo, visto que o cortisol poderia prejudicar o desenvolvimento gonadal e a qualidade dos gametas (Aluru & Vijayan, 2009). Os corticosteroides podem exercer efeitos positivos ou inibitórios sobre as funções reprodutivas pela presença de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição para realizar suas atividades fisiológicas nos tecidos reprodutivos como o testículo e o ovário (Mila et al., 2009). O comportamento social dos peixes poderia influenciar o teor de cortisol e a competência reprodutiva, pela produção de sinalizadores que induzem mudança neural (Fox et al., 1997). Foo & Lan (1993) relataram que peixes não-estressados apresentaram teor sorológico de cortisol inferior a 10 ng/mL ou 1 µg/dL, enquanto os estressados por confinamento ou captura apresentaram teores acima de 119 ng/mL ou 11,9 µg/dL. A exposição moderada aos agentes estressores pode produzir uma resposta adaptativa que restituiria o equilíbrio do organismo (Silveira et al., 2009). Entretanto, Barcellos et al. (1999) observaram que tilápias do Nilo submetidas ao estresse crônico se adaptaram aos estressores após um período de, aproximadamente, 44 dias, fato que pode ter ocorrido neste estudo. Os autores ressaltaram que a função do ACTH é reconhecida em teleósteos, porém evidências demonstram que este hormônio não atua sozinho, mas na presença de estimulantes como o neuropeptídeo Y, o fator liberador de corticotropina, concentração de melanóforos e na presença de inibitórios como a dopamina.

Determinados estudos realizados em humanos e animais relataram que agentes estressantes podem inibir a função hormonal dos testículos, reduzindo o teor de testosterona no sangue, porém outros dados sugerem que o estresse não interfere na produção de testosterona (Chichinadze & Chichinadze, 2008). Desta maneira, a redução (P<0,06) do teor de testosterona (Tabela 3), no soro de tilápias do Nilo submetidas à

homeopatia, $y = \exp^{6,2741 - 0,2269x}$, pode indicar a estabilidade da estrutura social, considerando a agressividade destes peixes, que são territorialistas e se submetem à hierarquia de dominância. Rajkumar et al. (2006) verificaram que a homeopatia aumentou a concentração sérica de estradiol em vacas, sendo eficaz na indução do estro. Apesar deste fato não estar relacionado com este estudo, destaca-se a resposta positiva da homeopatia na regulação hormonal de animais com complexa fisiologia digestória.

Os teores de *Homeopatila 100* na dieta de tilápias do Nilo não influenciaram (P>0,05) os linfócitos, neutrófilos, basófilos e as células jovens (Tabela 4). Entretanto, os monócitos foram reduzidos (P<0,07), linearmente, com homeopatia. Poucos eosinófilos foram observados, não sendo possível a análise estatística deste parâmetro.

Tabela 4 - Média estimada e erro-padrão dos elementos de defesa do sangue de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), durante de 90 dias

Parâmetros	Teor de *Homeopatila 100*/kg de ração				P<ChiSq
	Controle	2%	4%	6%	
Linfócitos (%)	88,17 ± 0,03	89,17 ± 0,02	90,07 ± 0,02	91,04 ± 0,03	0,43
Neutrófilos (%)	2,94 ± 0,18	2,74 ± 0,12	2,56 ± 0,12	2,39 ± 0,19	0,48
Monócitos (%)	4,69 ± 0,12	4,15 ± 0,08	3,66 ± 0,09	3,24 ± 0,15	0,07
Basófilos (%)	2,63 ± 0,15	2,48 ± 0,10	2,33 ± 0,11	2,19 ± 0,16	0,46
Células jovens (%)	1,62 ± 0,19	1,46 ± 0,13	1,33 ± 0,14	1,20 ± 0,22	0,36

A composição sanguínea dos peixes teleósteos pode estar relacionada a fatores como o sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal (Tavares-Dias et al., 2004).

Barros et al. (2002) verificaram o percentual de 87,33% de linfócitos no sangue de tilápias do Nilo, valor semelhante ao observado neste estudo. Os autores relataram que o valor mínimo de neutrófilos em tilápias do Nilo foi 3,00%. Porém, o número de leucócitos pode variar entre as espécies, entre peixes da mesma espécie em diferentes condições de manejo e ambiente (Tavares-Dias et al., 1999). A resposta primária ao estresse é a liberação de corticosteroides e adrenalina, enquanto a secundária é a canalização das ações e dos efeitos destes hormônios em nível sanguíneo e de tecidos e a terciária manifesta-se na população reduzindo crescimento, prejudicando a reprodução e a resposta imune (Lima et al., 2006), o que não se verificou na Tabela 4, principalmente, pela redução (P<0,07) linear do percentual de monócitos. Destaca-se

que quando a homeostasia dos peixes está abalada por condições estressantes causadas por infecções e/ou por variações ambientais, os animais podem responder positiva ou negativamente às dietas fornecidas (Signor et al., 2010). A quantificação das células de defesa do organismo auxilia no diagnóstico de estresse, visto que o aumento do número de leucócitos pode indicar resposta de defesa do organismo frente ao abalo da homeostasia (Azevedo et al., 2006).

A redução do cortisol (Tabela 3) e do percentual de monócitos (Tabela 4) sugere a manutenção da homeostasia com adição de teores de *Homeopatila 100.*

O peso do animal, peso da gônada direita, peso da gônada esquerda, o comprimento total do animal, o comprimento médio das gônadas (Tabela 5), não foram influenciados (P>0,05) pelos teores de *Homeopatila 100*, diferentemente do índice gonadossomático (Tabela 5) que aumentou (P<0,05) linearmente, $y = \exp^{1,1857 + 0,248}$, com a homeopatia. Estes resultados confirmaram a observação de Siena et al. (2010) que não verificaram influência de teores de *Homeopatila 100* no peso e comprimento total do animal. A semelhança entre o comprimento das gônadas que foi observado neste estudo com tilápias do Nilo, linhagem GIFT, está de acordo com o relato de Lacerda (2006), assim como a descrição da superfície lisa das gônadas também verificada nos peixes deste estudo.

Tabela 5 - Média estimada e erro-padrão da biometria do animal, da biometria das gônadas e do índice gonadossomático de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias

Parâmetros	Teor de *Homeopatila 100*/kg de ração			
	Controle	2%	4%	6%
Peso do animal (g)	187,10 ± 0,05	185,86 ± 0,03	184,64 ± 0,03	183,42 ± 0,05
Peso da gônada direita (g)	0,42 ± 0,28	0,46 ± 0,18	0,51 ± 0,17	0,56 ± 0,26
Peso da gônada esquerda (g)	0,46 ± 0,28	0,47 ± 0,18	0,49 ± 0,17	0,51 ± 0,26
Índice gonadossomático	0,39 ± 0,28*	0,50 ± 0,18*	0,64 ± 0,15*	0,83 ± 0,22*
Comprimento total do animal (cm)	21,50 ± 0,04	21,38 ± 0,03	21,25 ± 0,03	21,13 ± 0,04
Comprimento médio das gônadas (cm)	5,17 ± 0,18	5,25 ± 0,12	5,34 ± 0,12	5,42 ± 0,18

*P<0,05

O índice gonadossomático (Tabela 5) aumentou (P<0,05), linearmente, com a ração aspergida com diferentes teores de *Homeopatila 100*. Chao et al. (1987)

verificaram que o índice gonadossomático de seis espécies de tilápia variou de 0,07 a 2,71, intervalo semelhante aos dados observados neste estudo para esta espécie. De acordo com Soares et al. (2003), o índice gonadossomático está relacionado com a maturidade gonadal. Os autores destacaram, em estudo com matrinxã *Brycon amazonicus*, que valores abaixo de 0,5% do peso total do animal, são indicativos de indivíduos em fase inicial do desenvolvimento gonadal. Castro (2004) enfatizou que apesar do índice gonadossomático ser indicador do estado funcional das gônadas, a análise histológica permite melhor avaliação da condição reprodutiva.

A espessura do parênquima testicular e o percentual de espermatozoides, de espermátides, de espermatócitos, de espermatogônias primárias, de espermatogônias B, e de espermatogônias-tronco não foram influenciados (P>0,05) pela homeopatia (Tabela 6). O percentual de espermatôgonias A (Tabela 6) apresentou efeito quadrático (P<0,05), $y = \exp^{1,2253 + 0,7444x - 0,1410x2}$.

Tabela 6 - Média estimada e erro-padrão da espessura do parênquima testicular e das características histológicas dos testículos de tilápias do Nilo, alimentados com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias

Parâmetros	Teor de *Homeopatila 100*/kg de ração			
	Controle	2%	4%	6%
Espessura do parênquima testicular (µm)	813,30 ± 1,06	789,42 ± 1,11	766,24 ± 1,17	743,75 ± 1,22
Percentual de espermatozoides	9,02 ± 2,20	8,05 ± 2,09	8,70 ± 2,16	11,38 ± 2,43
Percentual de espermátides	4,48 ± 0,30	3,98 ± 0,19	3,53 ± 0,19	3,13 ± 0,31
Percentual de espermatócitos	2,28 ± 0,21	2,26 ± 0,14	2,25 ± 0,14	2,23 ± 0,20
Percentual de espermatogônias primárias	3,85 ± 0,21	3,59 ± 0,12	3,34 ± 0,13	3,13 ± 0,22
Percentual de espermatogônias A	6,23 ± 1,83*	8,58 ± 2,15*	8,93 ± 2,19*	7,00 ± 1,95*
Percentual de espermatogônias B	8,88 ± 1,17	8,94 ± 1,30	9,00 ± 1,45	9,05 ± 1,62
Número de espermatogônias-tronco	28,28 ± 0,06	28,14 ± 0,04	28,00 ± 0,04	27,87 ± 0,06

*P<0,05

Os cistos espermatogênicos são formados quando as células de Sertoli se unem às espermatogônias A (Lacerda et al., 2006). Desta maneira, supõe-se que o aumento do número de espermatogônias A (Tabela 6), nas gônadas de tilápias do Nilo, alimentadas com *Homeopatila 100* até o teor de 4% (Figura 1) por quilo de ração, resultou em aumento do número de células de Sertoli, fato que está relacionado com o aumento do

índice gonadossomático (Tabela 5), visto que a proliferação das células de Sertoli é considerada o fator primário responsável pelo aumento do testículo (Lacerda, 2006).

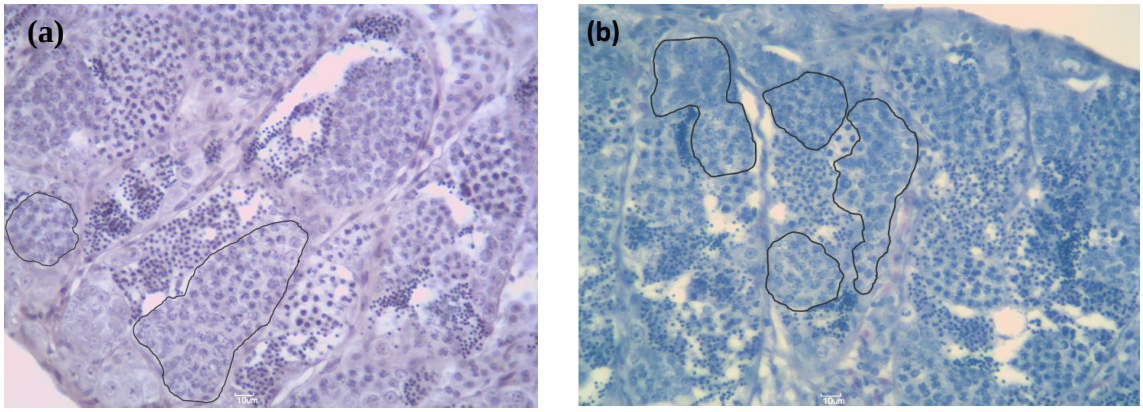

Figura 1 - Espermatogônias A nas gônadas de tilápias do Nilo alimentadas com 0 e 4% de *Homeopatila* 100/kg de ração, respectivamente, fotomicrografias (a) e (b). Coloração HE, em aumento 40 x e barra de 10 µm.

O aumento linear do índice gonadossomático (Tabela 5) sugere a proliferação de células somáticas. Destaca-se que animais em estação reprodutiva deveriam apresentar predomínio de espermatozoides nas gônadas, diferentemente dos resultados observados na Tabela 6.

Os resultados do ajuste do modelo linear generalizado ($\eta_i = b_0$) referente ao volume de sêmen colhido, a motilidade espermática, o vigor espermático, a concentração espermática, o número de espermatozoides no sêmen colhido, o pH, a cor e o percentual de espermatozoides normais, de espermatozoides anormais, de anormalidades primárias e de anormalidades secundárias pela *Homeopatila 100* (Tabela 7).

O volume de sêmen (Tabela 7) não foi influenciado ($P>0,05$) pelos teores de *Homeopatila 100* aspergidos na ração. O aumento do índice gonadossomático poderia refletir no aumento do volume do sêmen e dos teores de andrógenos (Castro, 2004), o que não foi verificado neste estudo.

A maioria das espécies de peixes não possui glândulas sexuais acessórias produtoras componentes orgânicos (Krol et al., 2006), sendo o plasma seminal produzido pelas gônadas e pelos ductos espermáticos (Mojica, 2004). Sanches et al. (2009) ressaltaram que variações no volume de sêmen podem ocorrer, pois a extrusão não garante a liberação total do sêmen presente nas gônadas.

Tabela 7 - Média estimada e erro-padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias

Parâmetros	Teor de *Homeopatila 100*/ kg de ração			
	Controle	2%	4%	6%
Volume de sêmen (mL)	0,13 ± 0,51	0,15 ± 0,33	0,17 ± 0,30	0,19 ± 0,45
Motilidade espermática (%)	39,13 ± 0,10	40,20 ± 0,07	41,48 ± 0,07	42,70 ± 0,10
Vigor espermático (pontos)[1]	2,89 ± 0,11	2,91 ± 0,07	2,92 ± 0,07	2,94 ± 0,11
Concentração espermática (espermatozoides/mL x 10^8)	8,40 ± 0,16	7,55 ± 0,11	6,79 ± 0,11	6,11 ± 0,17
Número de espermatozoides no sêmen colhido (x10^8)	2,11 ± 0,13	2,38 ± 0,08	2,68 ± 0,08	3,03 ± 0,12
pH	7,55 ± 0,07	7,52 ± 0,05	7,49 ± 0,05	7,46 ± 0.07
Cor (pontos)[2]	1,65 ± 0,15	1,68 ± 0,10	1,70 ± 0,09	1,73 ± 0,14
Espermatozoides normais (%)	47,08 ± 0,05	47,52 ± 0,03	47,96 ± 0,03	48,41 ± 0,05
Espermatozoides anormais (%)	52,91 ± 0,05	52,45 ± 0,03	52,00 ± 0,03	51,56 ± 0,05
Anormalidades primárias (%)	36,91 ± 0,06	37,42 ± 0,04	37,94 ± 9,04	38,46 ± 0,07
Anormalidades secundárias (%)	15,25 ± 0,16	15,19 ± 0,11	15,13 ± 0,11	15,07 ± 0,17

[1] 0 ponto indica ausência de vigor; 5 pontos indicam vigor máximo.

[2] 1 ponto indica a cor branca cremosa; 2 pontos, branco leitoso; 3 pontos, branco aquoso.

A motilidade espermática e o vigor espermático (Tabela 7) não foram diferentes (P>0,05) pela ingestão de ração contendo diferentes teores de *Homeopatila 100*. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Gerhard & Wallis (2002) observaram, em homens subférteis, que o tratamento homeopático aumentou a motilidade espermática após três e seis meses de tratamento.

Aziz & Enbergs (2005) observaram, no sêmen de bovinos, ao administrarem monensina homeopática, substância inibidora da atividade espermática em condições normais, mas que fornecida ao animal na diluição de nove vezes, aumentou de forma efetiva a atividade mitocondrial dos espermatozoides. No entanto, os referidos autores destacaram a necessidade de se realizarem estudos para avaliar os efeitos sobre a qualidade e a fertilidade do sêmen.

De acordo com Krol et al. (2006), a motilidade e a concentração espermática são os parâmetros que determinam a capacidade fertilizante do espermatozoide, sendo que a

concentração espermática pode, indiretamente, demonstrar o bom funcionamento das gônadas.

No presente estudo, a concentração espermática e o número de espermatozoides no sêmen colhido não foram influenciados (P>0,05) pela ingestão de ração contendo teores de *Homeopatila 100*. Gerhard & Wallis (2002) verificaram, em homens subférteis, que a homeopatia aumentou a concentração espermática. Segundo os autores, este parâmetro foi evidente somente após 12 meses de tratamento. Os autores destacaram que a alteração dos fatores ambientais como a presença de metais pesados, alteração de temperatura, radiação solar podem influenciar a espermatogênese, não evidenciando possíveis efeitos da terapia homeopática.

Com relação à cor do sêmen (Tabela 7) não se verificou diferença (P>0,05) entre os reprodutores alimentados com ração com diferentes teores de *Homeopatila 100,* mas a coloração branca leitosa predominou no sêmen destes peixes. Mataveli et al. (2010) associaram em tilápias do Nilo, linhagem Chitralada, a coloração branca cremosa a um sêmen que apresenta maior concentração de espermatozoides em relação às colorações branca leitosa e branca aquosa. A cor do sêmen pode estar associada ao pH, porém, nos quatro tratamentos,o valor predominante do pH foi, aproximadamente, 8.

O percentual de espermatozoides normais e anormais, de anormalidades primárias e de anormalidades secundárias (Tabela 7) não foi influenciado (P>0,05) pelos teores de *Homeopatila 100* na dieta de tilápias do Nilo. Lobreiro (2007) observou que a homeopatia reduziu as anormalidades espermáticas, além de aumentar a motilidade espermática de touro Nelore infértil, fato não verificado neste estudo. Streit Jr. et al. (2006) relataram que as anormalidades espermáticas são responsáveis pela redução da motilidade espermática, prejudicando a fertilização. Sanches et al. (2009) utilizaram sêmen de dourado *Salminus maxillosus* em ensaio de fertilização com 35,5% de espermatozoides normais, 27,7% de anormalidade primárias e 36,8% de anormalidades secundárias. Streit Jr et al. (2005) verificaram 57,0% de fertilização de oócitos, com sêmen de pacu *Piaractus mesopotamicus* com índice de anormalidades espermáticas de 49,4%. Sanches et al. (2009) ressaltaram que não há definição do índice de anormalidades espermáticas aceitável para peixes como há em mamíferos, cujo sêmen que apresente anormalidades espermáticas superiores a 30% é considerado inadequado para o uso em fertilização artificial ou monta natural.

Chenoweth (2005) afirmou que as anormalidades espermáticas são associadas com a infertilidade em diversas espécies. O autor destacou que as anormalidades na

estrutura espermática são causadas por fatores ambientais, genéticos ou ambos. As anormalidades são classificadas, de acordo com o autor, em as anormalidades primárias originadas durante a espermatogênese e as anormalidades secundárias desenvolvidas após a espermiação. De acordo com Kavamoto et al. (1998), as anormalidades morfológicas da peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade espermática, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios.

Os parâmetros quali-quantitativos não significativos do sêmen fresco de tilápias do Nilo, linhagem Chitralada, verificados por Mataveli et al. (2010) indicaram que a média estimada de volume de sêmen foi 63% maior do que a observada neste estudo, porém o índice de espermatozoides normais foi 64% menor. Os valores observados pelos referidos autores para as anormalidades primárias, o vigor espermático, o pH e a cor foram semelhantes aos resultados deste estudo com a linhagem GIFT.

A motilidade espermática, vigor espermático, tempo de ativação espermática, espermatozoides normais e anormais, anormalidades primárias e as secundárias do sêmen descongelado (Tabela 8) não foram influenciadas (P>0,05) pela ingestão dos teores de *Homeopatila 100* aspergidos na ração.

Tabela 8 - Média estimada e erro-padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen descongelado de tilápias do Nilo, alimentadas com teores de *Homeopatila 100* (0, 2, 4 e 6%), no período de 90 dias

Parâmetros	Teor de *Homeopatila 100*/kg de ração			
	Controle	2%	4%	6%
Motilidade espermática (%)	6,25 ± 0,30	5,34 ± 0,19	4,56 ± 0,20	3,89 ± 0,31
Vigor espermático (pontos)[1]	1,92 ± 0,17	1,78 ± 0,11	1,65 ± 0,11	1,52 ± 0,18
Tempo de sobrevivência (min)	4,02 ± 0,21	3,85 ± 0,13	3,68 ± 0,14	3,53 ± 0,22
Espermatozoides normais (%)	40,87 ± 0,06	39,76 ± 0,04	38,68 ± 0,04	37,63 ± 0,06
Espermatozoides anormais (%)	59,06 ± 0,04	60,18 ± 0,03	61,33 ± 0,02	62,50 ± 0,04
Anormalidades primárias (%)	27,10 ± 0,10	27,74 ± 0,06	28,39 ± 0,06	29,06 ± 0,09
Anormalidades secundárias (%)	31,92 ± 0,10	32,46 ± 0,06	33,01 ± 0,06	33,57 ± 0,09

[1] 0 ponto indica ausência de vigor; 5 pontos indicam vigor máximo.

Godinho et al. (2003) salientaram que a motilidade espermática, ao invés da taxa de fertilização, é um dos critérios mais adequados para avaliação do sucesso da

criopreservação do sêmen de tilápias. Os autores verificaram em tilápias do Nilo, linhagem Chitralada, que a motilidade espermática do sêmen pós-descongelado, criopreservado com DMSO, foi de 20-25%, porém os referidos autores selecionaram amostras de sêmen com motilidade espermática superior a 80%, fato que não foi possível neste estudo, visto que a motilidade espermática no sêmen fresco (Tabela 7) variou de 39,13 a 42,70%. Desta maneira, é possível que a motilidade espermática do sêmen fresco de tilápias do Nilo, linhagem GIFT, tenha contribuído com baixa motilidade espermática pós-descongelamento, não demonstrando os efeitos da homeopatia.

Sanches et al. (2009) destacaram que o tempo de sobrevivência dos espermatozoides pode ser afetado pelas soluções ativadoras, pelas concentrações osmóticas e iônicas e pelas temperaturas das soluções ativadoras. Os autores ressaltaram que o tempo de sobrevivência dos espermatozoides é um fator que influencia a taxa de fertilidade, assim como a relação espermatozoide:oócito.

Li et al. (2006) relataram que o processo de criopreservação influencia a integridade morfológica e funcional do espermatozoide, destacando a integridade da membrana plasmática e a função mitocondrial, os dois fatores mais importantes para a manutenção da viabilidade espermática. Os autores evidenciaram que os danos espermáticos como a desnaturação de proteínas, a deformação estrutural de organelas celulares, anormalidades na estrutura da cromatina e alterações genômicas, possam ter reduzido a motilidade espermática e o vigor espermático, culminando na redução da fertilidade.

A atividade mitocondrial é o parâmetro mais importante da viabilidade espermática e está correlacionada com a motilidade espermática (Aziz & Enbergs, 2005). Gonzalez (2004) ressaltou mudanças na arquitetura mitocondrial após a criopreservação espermática, observando que durante o resfriamento a 5°C ocorreu condensação, perda de material mitocondrial e alteração morfológica. O autor destacou que espermatozoides submetidos à congelação apresentam grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e após a descongelação perdas no conteúdo estrutural. Portanto, o autor relatou que como a fosforilação oxidativa e o transporte de prótons são realizados na membrana, é provável que a produção de adenosinatrifosfato seja prejudicada neste processo. Acredita-se que os resultados obtidos neste estudo, incluindo os espermatozoides descongelados de tilapia do Nilo, tenham sido influenciados pelo que foi exposto por Gonzalez (2004) e Li (2006). Desta maneira, os possíveis benefícios do

núcleo homeopático não se destacaram (P>0,05) nos parâmetros espermáticos do sêmen congelado.

Soto et al. (2010) verificaram que o núcleo homeopático, contendo *Avena sativa*, no meio diluidor, utilizado no resfriamento de sêmen de suínos, aumentou a motilidade progressiva e a taxa de prenhez. Possivelmente, estudos com a utilização de núcleo homeopático no meio diluidor do sêmen sejam necessários para contribuir com a viabilidade espermática do sêmen congelado de tilápias do Nilo.

Conclusão

Conclui-se que a adição de 6% *Homeopatila 100* aumentou o índice gonadossomático sendo recomendado para reprodutores de *O. niloticus*.

Referências

ALURU, N.; VIJAYAN, M.M. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. **General and Comparative Endocrinology**, v.164, n.3, p.142-150, 2009.

AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M. et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.32, n.1, p.41-49, 2006.

AZIZ, D.M.; ENBERGS, H. Stimulation of bovine sperm mitochondrial activity by homeopathic dilutions of monensin. **Homeopathy**, v.94, n.4, p.229-232, 2005.

BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; KLEEMANN, G.K. et al. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2149-2156, 2002.

BENITES, N. R. **Homeopatia**. In: SPINOSA, H.S.; GóRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Org.). Farmacologia aplicada À Medicina Veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.700-708.

BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G. et al. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v.30, n.6, p. 437-444, 1999.

BOMBARDELLI, R.A.; HAYASHI, C.; NATALI, M.R.M. et al. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p.941-949, 2010.

CASTRO, A.L.S. **Efeito dos estímulos visuais e químicos do sexo oposto na reprodução de tilápia-do-Nilo**. 2004. 40f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CHAO, N.; CHAO, W.; LIU, K. et al. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. **Journal of Fish Biology**, v.30, n.2, p.107-118, 1987.

CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.457-468, 2005.

CHICHINADZE, K.; CHICHINADZE, N. Stress-induced increase of testosterone: Contributions of social status and sympathetic reactivity. **Physiology & Behavior**, v.94, n.4, p.595-603, 2008.

CHIKRAMANE, P.S.; SURESH, A.K.; BELLARE, J.R. et al. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. **Homeopathy**, v.99, n.4, p.231-242, 2010.

DOBSON, A.J. **An introduction to generalized linear models**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 225p.

DZIEWULSKA, K.; DOMAGALA, J. Histology of salmonid testes during maturation. **Reproductive Biology**, v.3, n.1, p.47-61, 2003.

EL-SAYED, A.F.M. Environmental requeriments. In: EL-SAYED, A.F.M (Ed.). **Tilapia culture**. Egypt: CABI publishing. 2006. p.34-46.

FOO, J.T.W.; LAN, T.J. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture**, v.115, n.2, p.145-158, 1993.

FOX, H.E.; WHITE, S.A.; KAO, M.H.F. et al. Stress and dominance in a social fish. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.16, p.6463-6469, 1997.

FÜLBER, V.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.D. et al. Desempenho produtivo de três linhagens de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dois níveis de proteína. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.32, n.1, p.77-83, 2010.

GERHARD, I.; WALLIS, E. Individualized homeophatic therapy for male infertility**. Homeopathy**, v.91, n.3, p. 133-144, 2002.

GODINHO, H.P.; AMORIM, V.M.C.; PEIXOTO, M.T.D. Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1537-1543, 2003. Supl. 1.

GONZALEZ, R.Q.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.4, p.87-195, 2004.

KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, n.1, p.61-66, 1998.

KROL, J.; GLOGOWSKI, J.; DEMSKA-ZAKES, K. et al. Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during spawning period. **Czech Journal of Animal Science**, v.51, n.5, p.220-226, 2006.

KUBITZA, F. Ajustes na nutrição e alimentação das tilápias. **Panorama da Aqüicultura**, v.16, n.1, p.14-24, 2006.

LACERDA, S.M.S.N. **Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental**. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LACERDA, S.M.S.N.; BATLOUNI, S.R.; SILVA, S.B.G. et al. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Animal Reproduction**, v.3, n.2, p.146-159, 2006.

LARGELÖF, N. Morphologische unterprecheegen uber veranderugon in spermabild und in deuhoclen bei bullen mit vermindeter oder aufgehobenor fertilitat. **Acta Patholologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, 1934, 254 p.

LI, J.; LIU, K.; ZHANG, S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.24, n.4, p.370-377, 2006.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.113-117, 2006.

LOBREIRO, J. Homeopathic treatment for infertility in a prize Nelore bull. **Homeopathy**, v.96, n.1, p.49-51, 2007.

MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT JR., D.P. et al. Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.32, n.3, p.345-349, 2010.

MATOS, R.M.A. **A produção do conhecimento em homeopatia e seu ensino nas faculdades de medicina das Universidades Federais Brasileiras.** 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências e Saúde) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MERLINI, L.S. **Utilização de *Homeopatila 100* em dieta para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** 2006. 50p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

MILLA, S.; WANG, N.; MANDIKI, S.M.N. et al. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.153, n.3, p.242-251, 2009.

MOJICA, C.A.P. **Análise ultraestrutural e avaliação de peixes neotropicais *Brycon orbignyanus, Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei).** 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. 200p.

RAJKUMAR, R.; SRIVASTAVA, S.K.; YADAV, M.C. et al. Effect of a Homeopathic complex on oestrus induction and hormonal profile in anoestrus cows. **Homeopathy**, v.95, n.3, p.131-135, 2006.

ROS, A.F.H.; BOUTON, N.; SANTOS, R.S. et al. Alternative male reproductive tactics and the immunocompetence handicap in the Azorean rock-pool blenny, *Parablennius parvicornis*. **Proceedings of the Royal Society**, v.273, n.1589, p.901-909, 2006.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giensa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.329-334, 1947.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO,D.M. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2091-2098, 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS technical report: Release 6.07**. Cary, 1992. 229p.

SERVAIS, P.M. **Larousse da homeopatia**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2003. 318p.

SIENA, C.E.; NATALI, M.R.M.; BRACCINI, G.L. et al. Efeito do núcleo homeopático Homeopatila 100 na eficiência produtiva em alevinos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.4, p.985-994, 2010.

SIGNOR, A.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R. et al. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo: Efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.509-519, 2010.

SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTES, E.C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.4, p.1001-1017, 2009.

SOARES. M.C.F; URBINATI, E.C; SENHORINI, J.A. Variação periódica da triiodotironina (T3) plasmática e sua ação na reprodução induzida do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther; 1868) em cativeiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1825-1834, 2003.

SORENSEN, A. M. Jr. **A laboratory for animal reproduction**. 4. ed. Massachusetts: American Press. 1979. 153p.

SOTO, F.R.M.; VUADEN, E.R.; COELHO, C.P. et al. Reproductive performance of sows inseminated with diluted semen treated with homeopathic medicine. **International Journal of High Diluition Research**, v.9, n.30, p.51-57, 2010.

STREIT JR., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P. et al. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*) **Acta Scientiarum. Animal Science,** v. 27, n. 4, p. 439-447, 2005.

STREIT JR., D.P.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V. et al. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal**. Bioscience Journal**, v.22, n.3, p.119-125, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S. et al. Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.26, n.1, p.73-80, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1986 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.107-114, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.1, p.175-184, 1999.

VALENTIM-ZABOTT, M. **Avaliação de Homeopatila RS, em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), fase de larvicultura, no desenvolvimento, proporção sexual e histologia de brânquias e fígado**. 2006. 50f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. Effects of homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. **Homeopathy**, v.97, n.4, p.190-195, 2008.

VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa, 2009. v.1, p.106-131.

WILLIAMS, W.W. Technique of collection semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. **Cornell Veterinarian**, v.10, n.1, p.87-94, 1920.