

Desenvolvimento de protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce

Jéssica Queiroz Pardo¹, Alexandre Nizio Maria², Hymerson Costa Azevedo³, Rodrigo Yudi Fujimoto⁴, Paulo César Falanghe Carneiro⁵, Natalino da Costa Sousa⁶, Márcia Valéria Silva do Couto⁷, Peterson Emmanuel Guimarães Paixão⁸, João Carlos Nunes de Souza⁹

Resumo - A morfologia espermática é um parâmetro que avalia a estrutura física das células identificando possíveis alterações que possam ocorrer nos espermatozoides. Alterações nessas estruturas podem afetar a funcionalidade do espermatozoide interferindo na sua capacidade de deslocamento, fecundação e geração de descendentes. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce, utilizando o tambaqui (*Colossoma macropomum*) como modelo. Para isso os seguintes parâmetros foram avaliados: soluções fixadoras (formol citrato, formol salina e glutaraldeído), tempo de armazenamento da amostra fixada (0, 7, 14, 21 e 30 dias), método de preparo de lâmina (esfregação e câmaras úmida) e número de espermatozoides analisados (100, 200, 400 e 800 células). Os procedimentos utilizados neste estudo são preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para outras espécies. Sêmen de 10 machos sexualmente maduros foram avaliados inicialmente quanto a qualidade espermática, sendo selecionadas para o estudo amostras de sêmen que obtiveram mais de 80% de espermatozoides móveis. Essas amostras foram então fixadas em cada uma das soluções testadas e as células classificadas quanto às alterações morfológicas na cabeça (macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada e cabeça isolada) e na cauda (cauda fraturada, enrolada, degenerada e dobrada). Houve influência do tipo de fixador e do tempo de armazenamento da amostra na morfologia dos espermatozoides. As soluções fixadoras formol salina e glutaraldeído promoveram aumento nas alterações morfológicas quando comparadas ao formol citrato. Os métodos de preparo de lâminas bem como o número de células analisadas não influenciaram significativamente o resultado da avaliação da morfologia espermática. Desse modo, recomenda-se a diluição do sêmen em solução de formol citrato, o qual pode permanecer armazenado por 30 dias até a análise. A confecção da lâmina, por uma questão de praticidade, pode ser realizada por meio da técnica de esfregação e 100 células espermáticas analisadas para fins de avaliação morfológica dos espermatozoides.

Termos para indexação: morfologia, patologia, sêmen, peixe, solução fixadora.

Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é o peixe nativo mais cultivado no país principalmente pelas suas características de rusticidade e desempenho. Dentre os manejos empregados na criação estão aqueles voltados à reprodução, que fomentam a cadeia produtiva com as formas jovens, sendo fortemente influenciados pelo desempenho das matrizes e, em especial, dos machos reprodutores.

A escolha de reprodutores férteis, atestada por meio de avaliação andrológica, deve ser considerada como importante etapa do manejo reprodutivo nas pisciculturas. A seleção de machos com boa qualidade de sêmen pode garantir um bom desempenho reprodutivo e produtivo do plantel, possibilitando ainda a aplicação de práticas biotecnológicas na conservação e disseminação de material genético. A análise morfológica tem como objetivo avaliar a integridade das estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda, tendo em vista a capacidade fertilizante dos espermatozoides e consequentemente a fertilidade do sêmen. Qualquer alteração em uma dessas estruturas pode afetar a funcionalidade do espermatozoide por alterar basicamente a sua capacidade de deslocamento, fecundação e de geração de alevinos viáveis. Na preparação da amostra de sêmen para a avaliação morfológica dos espermatozoides geralmente há necessidade do uso de soluções fixadoras para manter inalteradas as características espermáticas. Além disso, os esfregaços podem ser confeccionados com corantes específicos que auxiliam a visualização das estruturas espermáticas que são translúcidas (Arruda et al., 2011; Streit-Jr et al., 2004) e de dimensão reduzida. A morfologia espermática é um parâmetro que avalia a estrutura física dos espermatozoides identificando as distintas alterações morfológicas que possam estar presentes na célula espermática, com o objetivo avaliar a integridade das estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda, tendo em vista a capacidade fertilizante dos espermatozoides e consequentemente a fertilidade do sêmen. As

¹Grauduanda em Medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁴Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁷Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁸Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁹Grauduanda em Medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

alterações na morfologia dos espermatozoides podem ser reflexos do estágio fisiológico, sanitário ou nutricional dos animais, além de efeitos do ambiente. Algumas dessas alterações podem ocorrer no processo de espermatogênese devido à má nutrição, ocorrência de enfermidades e estresse do reprodutor, sendo classificadas como alterações primárias. Já as alterações tidas como secundárias têm sua origem na manipulação do sêmen no momento da coleta, como por exemplo a excessiva pressão exercida sobre a cavidade celomática durante a coleta de sêmen de peixes (Maria et al., 2012). Outras alterações secundárias podem ter origem no preparo das lâminas quando da realização do esfregaço ou da câmara úmida (Miliorini et al., 2011), ou de artefatos da técnica pela incompatibilidade da solução fixadora com as características intrínsecas de uma determinada amostra de sêmen. A análise morfológica dos espermatozoides pode, juntamente com outras avaliações, prever o desempenho reprodutivo do macho no manejo da piscicultura e aumentar a efetividade da aplicação de biotecnologias da reprodução como a criopreservação do sêmen. Entretanto, a maioria das metodologias e práticas utilizadas para avaliação andrológica é baseada em procedimentos desenvolvidos para mamíferos sem a devida validação para peixes.

O desenvolvimento e padronização de um método de avaliação andrológica específico para peixes poderá aumentar a eficiência na seleção de espécimes destinados à formação de plantéis de reprodutores e como doadores de germoplasma para formação de bancos de sêmen para fins de conservação e disseminação de material genético em programas de melhoramento. Assim o presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce, utilizando o tambaqui (*Colossoma macropomum*) como modelo, por meio da avaliação de soluções fixadoras, tempo de armazenamento da amostra fixada, método de preparo de lâmina e número de espermatozoides analisados.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Piscicultura Santa Clara, situada no município de Propriá, Sergipe e no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Aracaju, Sergipe.

Para realização dos experimentos 10 machos sexualmente maduros foram selecionados para indução hormonal e posterior coleta do sêmen, segundo metodologia descrita por Maria et al. (2012). Após a coleta, o sêmen de cada animal foi inicialmente avaliado quanto à qualidade por meio da análise da motilidade espermática, sendo selecionadas para compor as parcelas experimentais as amostras que apresentaram motilidade superior a 80%.

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito das soluções fixadoras e do tempo de armazenamento da amostra fixada sobre a morfologia espermática. Para isso, alíquotas de sêmen (n=10 peixes) foram diluídas em soluções fixadoras de formol-citrato, formol-salino e glutaraldeído 0,2% na proporção 1:99 (sêmen:solução). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 dias e avaliadas semanalmente (0, 7, 14, 21 e 30 dias) após realização de esfregaços em lâmina. Os esfregaços foram realizados em uma lâmina por meio da adição de uma gota de sêmen fixado e uma gota do corante rosa bengala (Streit-Jr, et al., 2004) na proporção 1:30 (sêmen fixado:corante). Após a secagem, as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (1000x), sendo analisadas 200 células na avaliação da morfologia espermática em diversos campos da lâmina, percorrida em zigue-zague.

As alterações morfológicas foram classificadas segundo Maria et al. (2010): a) alterações na cabeça: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada e cabeça isolada; b) alterações na cauda: cauda fraturada, cauda enrolada, cauda degenerada e cauda dobrada. A peça intermediária não foi avaliada neste estudo devido à baixíssima incidência de alterações morfológicas observada nessa região.

O segundo experimento teve como objetivo avaliar duas metodologias de preparo de lâmina para análise morfológica: a) esfregaço para visualização em microscópio de luz, conforme descrita acima e; b) câmara úmida para visualização em microscópio de luz com contraste de fase. Na câmara úmida, uma alíquota do sêmen fixado foi colocada sobre uma lâmina e posteriormente coberta com lamínula e levada ao microscópio para análise. O sêmen (n=10 peixes) foi fixado na melhor solução determinada no primeiro experimento sendo analisadas 200 células por lâmina.

O terceiro experimento teve como objetivo avaliar se o número de células espermáticas analisadas tem influência no resultado da análise morfológica. Para isso o sêmen (n=10 peixes) foi fixado na melhor solução do primeiro experimento. Uma amostra foi adicionada em uma lâmina com corante rosa bengala onde foi realizado o esfregaço. Foram analisadas 100, 200, 400 e 800 células espermáticas em cada lâmina conforme metodologia descrita acima.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Houve influência do tipo de fixador e do tempo de armazenamento da amostra na morfologia dos espermatozoides. As soluções formol salina e glutaraldeído 0,2% promoveram aumento nas alterações morfológicas dos espermatozoides em relação ao formol citrato (Tabela 1). Após uma semana de armazenamento, as amostras fixadas em glutaraldeído 0,2% apresentaram aumento significativo nas alterações morfológicas da cauda dos espermatozoides. Além disso, a interação entre o corante e o fixador causou uma intensa sujidade nas lâminas, dificultando a análise. Essas sujidades, no entanto, não foram observadas nas amostras fixadas nas soluções que continham formol em sua composição. Estes fixadores proporcionaram melhor distribuição das células espermáticas na lâmina após o esfregaço, tornando a amostra mais homogênea e livre de aglutinação. Soluções fixadoras contendo formol em sua constituição têm sido empregadas na rotina de muitos laboratórios, devido sua eficiência (Salviano et al., 2011), no entanto, existem reações espécie-específicas entre fixadores e corantes (Harasymowycz et al., 1976) que devem ser avaliadas para fins de padronização da análise de sêmen. Ao contrário do observado no presente estudo, Streit-Jr et al. (2004), recomendam a utilização da solução formol salina juntamente com o corante rosa bengala na análise morfológica dos espermatozoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). No presente estudo esta combinação promoveu aumento nas alterações morfológicas na cabeça e na cauda dos espermatozoides imediatamente após a adição do sêmen à solução, permanecendo durante todo período avaliado.

Tabela 1. Alterações morfológicas (%; média±desvio-padrão) na cabeça e cauda dos espermatozoides fixados em formol citrato, formol salina e glutaraldeído e avaliados semanalmente durante 30 dias.

Alterações Morfológicas (%)	Solução fixadora	Tempo de Avaliação (dias)				
		0	7	14	21	30
Cabeça	F. Citrato	1,0±1,0aA	1,1±1,1 aA	0,7±0,4aA	1,8±1,7 aA	1,2±1,4 aA
	F. Salina	1,7±1,4 bA	1,8±2,0 bA	2,9±2,5 bA	2,5±1,7 bA	1,6±1,4 bA
	Glutaraldeído	1,6±1,3 bA	1,7±1,6 bA	1,8±1,5 bA	2,0±1,6 bA	2,8±4,0 bA
Cauda	F. Citrato	10,7±4,8aA	12,3±6,0aA	10,8±5,4aA	10,4±4aA	9,8±3,9aA
	F.Salina	15,2±5,7bA	16,1±6,4bA	16,4±6,8bA	18,2±7,5bA	15,6±5,0bA
	Glutaraldeído	12,1±5,2aA	22,1±8,9bB	19,6±7,1bB	22±9,9bB	22,8±14,7bB

^{aA} Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

Os métodos de preparo de lâminas não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) o resultado da avaliação da morfologia espermática (Figura 1). Desse modo, recomenda-se a preparação de lâmina com a técnica de esfregaço, pois necessita apenas de um microscópio de luz para visualização das células coradas. A câmara úmida por outro lado necessita a utilização do microscópio de luz com contraste de fase, que é um equipamento de custo mais elevado. Os dois métodos permitem uma boa visualização do contorno e divisões da célula espermática, permitindo identificar alterações na morfologia de forma simples e prática.

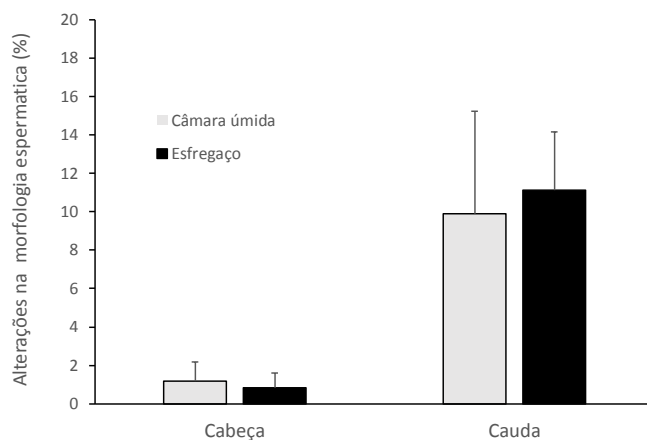


Figura 1. Porcentagem de alterações na morfologia da cabeça e cauda dos espermatozoides de acordo com o método de preparo de lâmina (câmara úmida e esfregaço).

No presente estudo foi observado que o número de células analisadas não influenciou significativamente o resultado da avaliação da morfologia espermática (Figura 2), sendo indicado por questões práticas a avaliação de 100 células.

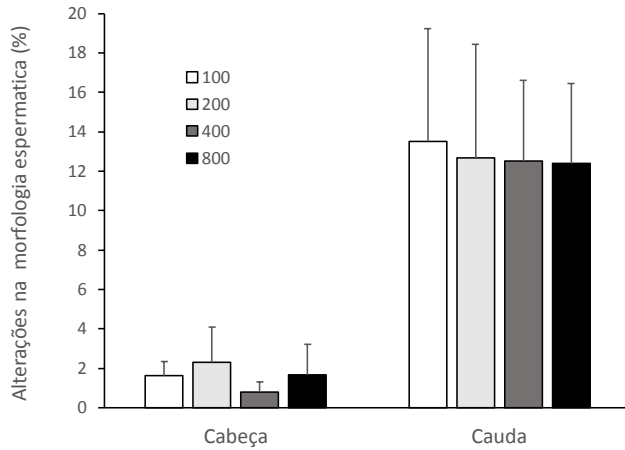


Figura 2. Porcentagem de alterações na morfologia da cabeça e cauda dos espermatozoides de acordo com o número de células avaliadas (100, 200, 400 e 800 células).

Conclusões

Concluimos que o sêmen deve ser fixado em solução de formol citrato, o qual pode permanecer armazenado por 30 dias até a análise. A confecção da lâmina, por uma questão de custo e praticidade, pode ser realizada por meio da técnica de esfregaço e 100 células espermáticas analisadas para fins de avaliação da morfologia dos espermatozoides.

Referências

- ARRUDA, R. P. de.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- HARASYMOWYCZ, J.; BALL, L.; SEIDEL, E. Evaluation of bovine spermatozoal morphological features after staining or fixation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1053-1057, 1976.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v. 20, n. 1, p. 39-43, 2012.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779-783, 2010.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; DACOSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-187, 2011.
- SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T.; VIDIGAL, K. F. Efeitos da fixação do sêmen pós-teste hiposmótico para avaliação da membrana espermática de caprinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 16, 2011.
- STREIT JÚNIOR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D.; OLIVEIRA, C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 7, p. 157-162, 2004.