

Fertilização de Ovócitos de Tambaqui com Sêmen in Natura

Allisson Fabiano Silva Ferro¹; Giselle Santana Barreto²; Carlos Adriano Silva Rocha Moraes²; Jadson Pinheiro Santos³; Rafael Venâncio Araújo⁴; Alexandre Nízio Maria⁵; Paulo César Falanghe Carneiro⁶

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram determinar a relação espermatozoides:ovócito adequada na fertilização de ovócitos de tambaqui com sêmen in natura e avaliar diferentes ativadores na fertilização de ovócitos de tambaqui com sêmen in natura. Após a coleta do sêmen de seis machos, a cinética espermática foi avaliada pelo sistema computadorizado Sperm Class Analyser (SCA[®]) iniciando em 10 segundos após o início da ativação espermática e repetindo a intervalos de 5 segundos durante 55 segundos. Foram avaliados os seguintes parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MT - %); motilidade progressiva (MP - %); velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m.s}^{-1}$); velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m.s}^{-1}$); e velocidade do trajeto médio (VAP - $\mu\text{m.s}^{-1}$). Para a fertilização, foram testadas quatro relações espermatozoides:ovócito, entre 10.000 e 500.000, e três ativadores, NaHCO₃, NaCl e a água do tanque dos reprodutores. Para os parâmetros de cinética espermática, o NaHCO₃ manteve por mais tempo a ativação dos espermatozoides sem alterações significativas quando comparado ao NaCl e a água do tanque. As melhores relações espermatozoides:ovócito observadas foram 10.000:1 quando se utilizou o NaCl como ativador (taxa de fertilização = $87 \pm 2\%$). Conclui-se que soluções salinas de NaHCO₃ e NaCl

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE,

² Graduando do curso de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, evelyn_sill@hotmail.com.

³ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE,

⁴ Zootecnista, pós-doutorando FAPITEC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶ Engenheiro-agrônomo, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

230 mOsm.kg⁻¹ apresentam-se como ativadores mais adequados na fertilização artificial de ovócitos do tambaqui, sendo possível o emprego da relação espermatozoides:ovócito 10.000:1 na fertilização com sêmen *in natura*.

Palavras-chave: espermatozóides, *colossoma macropomum*, cinética espermática, fertilização, ativação.

Introdução

Nos últimos anos a piscicultura vem apresentando crescente incremento na produção de pescado nacional, sendo o Nordeste a região maior produtora com 411.000 toneladas/ano, e o tambaqui *Colossoma macropomum* a espécie nativa de maior destaque, com aumento de produção de 123% entre os anos 2003 e 2009 (MPA, 2010; IBAMA, 2007).

Apesar das técnicas de reprodução artificial de espécies reofílicas, peixes migradores como o tambaqui, estarem bem estabelecidas, poucos estudos focam a otimização dos reprodutores e seus gametas nos procedimentos de fertilização artificial. Com isso, muitas vezes é utilizada alta relação machos: fêmea e quantidade exacerbada de sêmen, subestimando-se a real capacidade de fertilização e elevando os custos de produção. Adicionalmente, poucos estudos são feitos visando a avaliação de ativadores da motilidade espermática, o que poderia aumentar ainda mais a otimização dos procedimentos de reprodução artificial de peixes reofílicos. Portanto, os objetivos deste trabalho foram determinar a relação espermatozóides: ovócito adequada na fertilização de ovócitos de tambaqui com sêmen *in natura* e avaliar diferentes ativadores na fertilização de ovócitos de tambaqui com sêmen *in natura*.

Material e Métodos

Os ovócitos de uma fêmea induzida com extrato hipofisário foram extraídos por massagem abdominal, armazenados em bacias limpas e secas e, posteriormente, pesados e quantificados. Sêmen de três macho, também

induzidos hormonalmente, foi coletado em tubos de ensaio por massagem abdominal, tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação por fezes, urina, sangue e/ou água. Foram utilizadas amostras seminais com motilidade espermática superior a 80% mantida sob-refrigeração entre 4 e 6 °C para as avaliações. As amostras seminais foram ativadas com três soluções diferentes: NaHCO₃ 230 mOsm, NaCl 230 mOsm e água do tanque de contenção dos reprodutores (12 mOsm).

Para a avaliação da cinética espermática foi utilizado o analisador computadorizado. Alíquotas de 3 μ L de cada amostra de sêmen in natura e descongelado foram transferidas para microtubos e ativadas, respectivamente, com 100 e 50 μ L das seguintes soluções ativadoras: NaHCO₃ 230 mOsm, NaCl 230 mOsm e água do tanque de contenção dos reprodutores. Posteriormente uma gota de 3 μ L do sêmen ativado foi transferida para uma câmara Makler® previamente posicionada no charriot do microscópio acoplado a uma câmera de vídeo.

Para cada amostra foram capturadas automaticamente 10 vídeos de 1 segundo cada (100 imagens por segundo) iniciando em 10 segundos após a ativação espermática e com intervalos de 5 segundos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MP - %), velocidade curvilínea (VCL - μ m s⁻¹), velocidade em linha reta (VSL - μ m s⁻¹) e velocidade da trajetória média (VAP - μ m s⁻¹).

Os ovócitos foram fertilizados com o sêmen de três machos homogeneizados na forma de "pool". Após a avaliação da cinética e da concentração espermática do "pool" de sêmen e da quantificação dos ovócitos, alíquotas de 0.5 mL de ovócitos foram acondicionadas em copos plásticos com capacidade para 50 mL e testadas as seguintes relações espermatozoides: ovócito: 10,000:1, 50,000:1, 100,000:1, e 500,000:1. Posteriormente, foi avaliada a ativação da motilidade e início da fertilização pela adição de 5 mL dos seguintes ativadores: bicarbonato de sódio 230 mOsm, cloreto de sódio 230 mOsm e água do tanque de contenção dos reprodutores (12 mOsm).

Dois minutos após o início da fertilização, os ovos foram transferidos para incubadoras de cano de PVC (100 mm de diâmetro x 150 mm de altura, volume útil aproximado de um litro) com fundo telado (500 μ m). A taxa de fertilização (TF) foi calculada 6-8 h após a fertilização em cada amostra com o

auxílio de um estereomicroscópio modelo ZEISS STEMI 2000-2, a temperatura 27-29 °C, de acordo com a seguinte equação: TF (%) = (número de ovócitos fertilizados/número total de ovos) x 100.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e, quando identificado alguma diferença significativa, foi aplicado o teste de médias Skott-Knott, ambos a 5% de significância pelo programa estatístico SISVAR 5.3.

Resultados e Discussão

A motilidade total (MT) foi significativamente mais elevada para o sêmen ativado com NaHCO_3 em todos os tempos a partir dos 20 s. Quando ativado com NaHCO_3 a MT somente apresentou diminuição significativa dos valores iniciais a partir dos 30 s após a ativação, tempo superior ao observado com os outros ativadores (25 s para NaCl e 20 s para água). Sêmen ativado com NaHCO_3 também apresentou valores mais elevados de motilidade progressiva (MP) 10 s após a ativação, porém foi observada queda significativa deste parâmetro a partir dos 15 s para o sêmen ativado com água e com NaHCO_3 , e a partir dos 20 s para o sêmen ativado com NaCl (Figura 1).

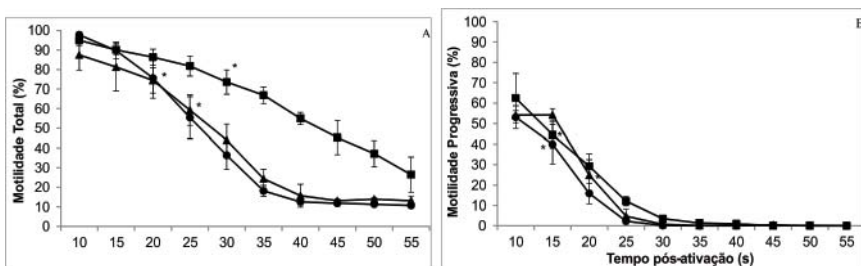


Figura.1. Motilidade total (A) e progressiva (B) do sêmen de tambaqui ativado com diferentes soluções (■- NaHCO_3 , ▲- NaCl e ●- água de tanque) e avaliados por 55 s pós-ativação. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao valor em 10 s.

Nos momentos iniciais, 10 e 15 s após a ativação, o NaCl apresentou-se como melhor ativador quando observados os parâmetros de velocidade curvilinear, velocidade em linha reta e velocidade da trajetória média (VCL, VSL e VAP). Quedas significativas nas velocidades espermáticas foram registradas 15 s após a ativação para todos os ativadores utilizados. (Figura 2).

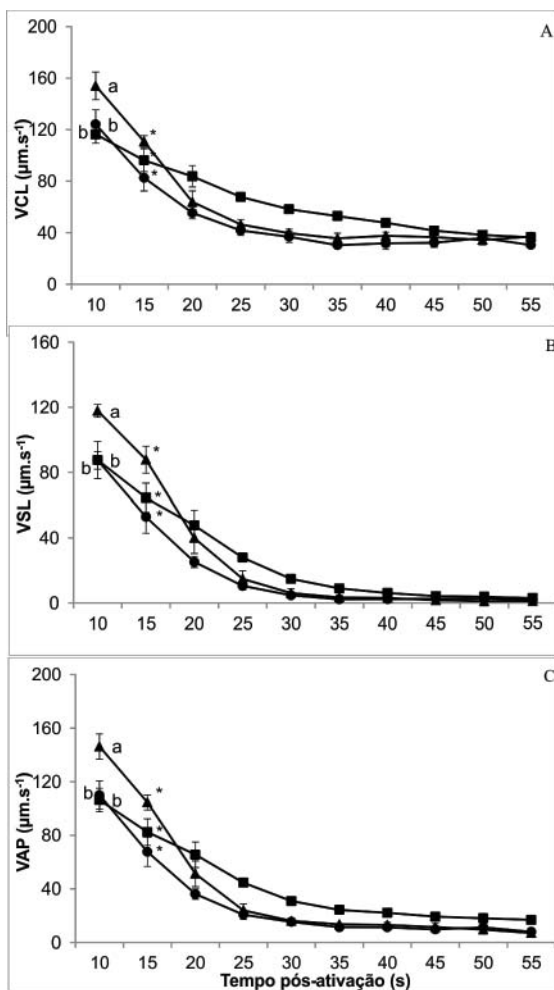


Figura.2. Velocidade curvilinear - VCL (A), velocidade em linha reta - VSL (B) e velocidade da trajetória média - VAP (C) do sêmen de tambaqui, ativado com diferentes ativadores (■- NaHCO₃, ▲- NaCl e ●- água de tanque) e avaliados durante 55 s pós-ativação.

Quando o sêmen foi utilizado para fertilizar ovócitos de tambaqui, não foi observada interação significativa entre os ativadores da motilidade espermática e a relação espermatozoides: ovócito utilizada na fertilização ($p > 0,05$). Para o NaCl a relação espermatozoides: ovócito 10.000:1 possibilitou a mesma taxa de fertilização que as demais proporções testadas. Já para os ativadores NaHCO_3 e água de tanque, aumento significativos nas taxas de fertilização foram encontrados a partir da relação 50.000 espermatozoides por ovócito ($p > 0,05$, Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de fertilização (média \pm desvio-padrão) dos ovócitos de tambaqui.

Ativador	Relação espermatozoides: ovócitos			
	10,000:1	50,000:1	100,000:1	500,000:1
NaHCO_3 230 m Osm	83 \pm 4 b*	93 \pm 4 a	95 \pm 4 a	97 \pm 1 a
NaCl 230 m Osm	87 \pm 2 a	90 \pm 3 a	92 \pm 5 a	94 \pm 4 a
Água de tanque	77 \pm 2 b*	92 \pm 1 a	95 \pm 5 a	91 \pm 5 a

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$). *Indica diferença significativa pelo teste Skott-Knott ($p < 0,05$) entre as relações espermatozoides: ovócito.

Pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação da motilidade espermática em espécies de peixes tropicais. Recentemente foi demonstrado que a utilização de NaHCO_3 e NaCl 230 mOsm kg^{-1} como soluções ativadoras da motilidade espermática de sêmen de tambaqui proporciona maiores taxas de motilidade e maior tempo de movimentação dos espermatozoides (CARNEIRO et al., 2012). De acordo com Valdebenito et al. (2009), a utilização de soluções salinas possibilita o prolongamento do tempo de motilidade espermática como também da intensidade do batimento flagelar, tendo como resultado final a melhora na capacidade fecundante do sêmen.

No presente estudo, os melhores resultados de fertilização com sêmen *in natura* ativado com NaCl pode ser explicado pelos valores mais elevados de velocidade espermática também observados para este mesmo ativador. A taxa de fertilização está ligada tanto ao tempo de motilidade espermática quanto ao período de fechamento da micrópila do ovócito. Em briconídeos observou-se a presença de espermatozoides na micrópila dos ovócitos entre 10 e 20 s

após a ativação. Após a penetração do primeiro espermatozoide na micrópila, ocorre sua fusão com a membrana do ovócito, seguida da ativação de diversos eventos que constituem o bloqueio à polispermia (MARIA, 2008).

Tem-se como desafio para otimizar os procedimentos de reprodução artificial de peixes a obtenção de altas taxas de fertilização com o uso de quantidades mínimas de espermatozoides para a fertilização do maior número de ovócitos (RURANGWA et al., 2004). Diversos autores têm encontrado relações espermatozoides: ovócito para espécies tropicais variando de 7.103 a 12.106 (SANCHES et al., 2009; SANCHES et al., 2011; BOMBARDELLI et al., 2006). Leite et al. (2011) aponta 100,000:1 como a melhor relação espermatozoide: ovócito para o tambaqui, utilizando a água do tanque dos reprodutores como ativador. VarelaJunior et al. (2012), também trabalhando com tambaqui, conseguiram altas taxas de fertilização utilizando 70,000 espermatozoides por ovócito e água destilada como ativador. Estes valores são 7 a 10 vezes superiores ao encontrado no presente trabalho utilizando o NaCl como ativador.

Conclusões

NaCl 230 mOsm kg⁻¹ apresenta-se como ativador adequado para o sêmen do tambaqui possibilitando o emprego da relação espermatozoide:ovócito 10,000:1 nos procedimentos de fertilização artificial.

Agradecimentos

À EMBRAPA pela disponibilização do laboratório onde foram realizadas as análises, à Piscicultura Santa Clara pela disponibilização dos reprodutores e à FAPITEC e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

BOMBARDELLI, R. A.; MORSCHBACHER E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, p. 1251-1257, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Produção pesqueira e aquícola: estatística 2008 e 2009**. Brasília, DF, 2010.

CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, Cambridge, GB, v. 33, p. 385-393, 2012.

LEITE, L. V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma Macropomum*)**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

MARIA, A. N. **Caracterização ultra-estrutural dos gametas aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Gunther, 1864)**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, p. 1-28, 2004.

SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, p. 2091-2098, 2009.

SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; PIANA, P. A.; SOUZA, B. E.; BOMBARDELLI, R. A. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and *in natura* semen preservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, p. 1-6, 2011.

VALDEBENITO, I.; FLETCHER, C.; VERA, V.; FERNÁNDEZ, J. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, CL, v. 41, p. 97-106, 2009.

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