

Caracterização do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante período reprodutivo

Semen characterization of tambaqui (Colossoma macropomum) during the breeding season

Dayane Regina Lenz¹, André de Moura Victorio^{1,2*}, Mayanny Carla Carvalho Lima³, Tayrone Freitas Prado³, Fernanda Gomes de Paula³, Maria Lucia Gambarini Meirinhos³ & Emmanuel Arnhold³

¹Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural, Curitiba, PR, Brasil. *Autor para correspondência: amvictorio@hotmail.com.

²Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.

³Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

Submissão: 25/07/2017 | Aceite: 13/06/2018

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho caracterizar qualitativamente e quantitativamente o sêmen de tambaqui durante o período reprodutivo. Foram realizadas três coletas, com intervalos regulares de aproximadamente 30 dias no período reprodutivo de 2012/2013. Foram utilizados dez reprodutores de no mínimo três anos de idade. Para a coleta de sêmen foi realizada indução hormonal com extrato de hipófise de carpa, e a extração do sêmen ocorreu por massagem abdominal. Após coleta, o sêmen foi submetido a avaliações de motilidade, vigor, tempo de vida, volume do ejaculado e concentração espermática. As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, e as variáveis qualitativas ao teste de Friedman, com significância de 0,05. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a maioria dos parâmetros avaliados. A concentração espermática variou significativamente entre as coletas (14,5, 3,7, e $8,3 \times 10^9$ espermatozoides/mL) e o tempo de vida diminuiu significativamente entre a segunda e terceira coletas (267,8 e 98,5 segundos, respectivamente).

PALAVRAS-CHAVE: Characidae, espermatozoide, espermograma.

ABSTRACT

This study aims to qualitatively and quantitatively characterize the semen of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the breeding season. Three samplings were made at regular intervals of approximately 30 days in the 2012/2013 breeding season. Ten adult males of at least three years old age were selected. To collect the semen, hormonal induction was performed with carp pituitary extract, and extraction occurred by abdominal massage. After collection, the semen was subjected to evaluation of motility, vigor, lifetime, ejaculate volume, and sperm concentration. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were applied on quantitative variables, while the Freedman test was used with 0.05 significance on qualitative variables. No significant differences ($p > 0.05$) were observed for most parameters evaluated. Sperm concentration significantly varied between samples (14.5, 3.7, and 8.3×10^9 sperm/mL) and lifetime decreased significantly between the second and third samples (267.8 e 98.5 seconds, respectively).

KEYWORDS: Characidae, espermatozoa, semen analysis.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a segunda espécie mais produzida em aquicultura no Brasil e na América do Sul. A espécie é nativa da bacia amazônica e pode chegar a 40 kg de peso e 104 cm de comprimento na natureza, apresentando comportamento alimentar predominantemente onívoro. Seu comportamento reprodutivo na natureza é de padrão migratório, com seu período reprodutivo relatado entre setembro e fevereiro. Em cativeiro, sua reprodução é possível através de indução hormonal, respeitando as particularidades da espécie (PIRES et al. 2017).

O conhecimento dos parâmetros seminais é fundamental no estudo da reprodução de peixes, pois informações a respeito das características dos espermatozoides permitem que se tenha conhecimento sobre a biologia reprodutiva de uma espécie, tanto para fins de conservação, quanto para a produção de formas jovens em cativeiro (LAHNSTEINER 2003). No entanto, o conhecimento a respeito da biologia reprodutiva e caracterização seminal está restrito a algumas espécies, ainda que, dentre os vertebrados, os

peixes possuam a maior variabilidade de características seminais e hábitos reprodutivos espécie-específicas (SHULZ et al. 2010, SALMITO-VANDERLEY et al. 2015).

A qualidade do sêmen é um dos fatores determinantes para o sucesso da fertilização dos ovócitos, já que se deve disponibilizar espermatozoides de boa qualidade e em quantidade suficiente para uma dose inseminante mínima e taxa de fertilização máxima (LEITE et al. 2013). A motilidade espermática progressiva, duração da motilidade e o vigor espermático, que é caracterizado pela velocidade em que os espermatozoides se movimentam, são fatores que devem ser avaliados na determinação da qualidade dos espermatozoides (BILLARD et al. 1995).

Informações básicas como o volume de sêmen e a concentração espermática são essenciais para se determinar como serão conduzidas as atividades de reprodução artificial de peixes em cativeiro, podendo-se determinar, por exemplo, a diluição do sêmen e a razão entre machos e fêmeas no manejo reprodutivo (MARIA et al. 2010, LEITE et al. 2013).

Ainda que vários estudos tenham sido realizados sobre as características seminais de algumas espécies brasileiras (STREIT JÚNIOR et al. 2006, GOES et al. 2017, SANCHES et al. 2009, ROMAGOSA et al. 2010), estudos a respeito da caracterização do sêmen do tambaqui e sua variação sazonal ainda são escassos, apesar do uso repetido de reprodutores durante o período reprodutivo ser uma prática comum em pisciculturas (MARIA et al. 2010, VIEIRA et al. 2011, PIRES et al. 2017, MARTINS et al. 2017). Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o sêmen de tambaqui durante período reprodutivo, a fim de fornecer informações para o manejo reprodutivo da espécie em cativeiro.

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013, nos setores de Piscicultura e de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG), Campus II – Samambaia, em Goiânia, GO. Foram selecionados dez exemplares machos da espécie *Colossoma macropomum*, sexualmente maduros, com idade mínima de três anos, que liberaram sêmen com leve pressão abdominal sem indução hormonal. Após a seleção, os indivíduos foram identificados individualmente, pesados e encaminhados ao laboratório de reprodução de peixes do setor de Piscicultura da EVZ-UFG, onde foram acondicionados em caixas d'água de volume de 1000 L com fluxo de água contínuo e submetidos à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa, na quantidade de 2,0 mg/kg de peso vivo, diluído em solução salina de NaCl 0,9%, na quantidade de 0,5 mL/kg de peso vivo e aplicado via intraperitoneal. O peso dos peixes utilizados variaram entre 2,8 e 6,0 kg, com média de 4,1±1,1 kg. Após a primeira pesagem, os peixes mantiveram peso constante até o final do experimento.

Após 12 h da indução hormonal, os peixes foram submetidos à extrusão dos gametas por pressão abdominal no sentido céfalo-caudal, realizada em meio seco, sem presença de água, urina ou sangue. O sêmen foi coletado em seringas graduadas de 10,0 mL previamente etiquetadas com a identificação de cada reprodutor e o número da amostra coletada. Foram coletadas sucessivas amostras até que não houvesse mais liberação de sêmen, de modo que a quantidade de sêmen liberada por cada reprodutor fosse exaurida.

Foi realizado o teste de contaminação, que consistiu em avaliar a motilidade espermática com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 400X, sendo rejeitadas as amostras com mais de 1% de motilidade no campo óptico antes da ativação com água. Atestada a viabilidade das amostras, o sêmen foi acondicionado em caixa térmica com gelo, na temperatura de aproximadamente 5 °C e transportado ao setor de Reprodução Animal da EVZ-UFG para avaliação da qualidade.

Após a primeira coleta, os reprodutores foram acondicionados em viveiro de 50 m² de área de lâmina d'água, previamente desinfetados e adubados e com renovação de água constante, onde foram mantidos durante o período de coletas, sendo retirados apenas para o manejo reprodutivo. A alimentação dos reprodutores foi realizada uma vez a cada dois dias, no final da tarde, com ração extrusada contendo 42% de proteína bruta e *pellets* de 10-12 mm, na taxa de 0,5% do peso vivo. Foram realizadas três coletas com intervalos regulares de aproximadamente 30 dias entre coletas, com os mesmos animais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (Protocolo 059/12).

Para a realização da avaliação quantitativa, primeiramente foi realizada a mensuração da quantidade de sêmen liberada por cada reprodutor em mL para a verificação da variação da quantidade de sêmen liberada em função do tempo numa mesma época de reprodução. O tempo de vida foi estimado com cronômetro, disparado no momento da ativação e parado quando o último espermatozoide do campo de visão cessou sua movimentação. A determinação da concentração espermática foi realizada com o sêmen diluído na proporção de 1:4000 em solução de formol salina tamponada (10%) e consecutiva contagem na câmara hematómica de Neubauer, para a determinação do número de espermatozoides por mL de sêmen

de cada amostra.

Dentre as variáveis qualitativas, foram avaliadas a motilidade e vigor espermático. A avaliação de motilidade espermática foi realizada em todas as amostras viáveis de sêmen, na qual em uma lâmina para microscopia foi colocado 0,01 mL de cada amostra de sêmen e ativada com água na proporção de 1:20 (sêmen:água). Foi utilizada uma lamínula sobre a amostra e esta observada em microscópio óptico pré-ajustado na objetiva de 400X, e foi determinada subjetivamente a porcentagem de espermatozoides móveis no campo de visão.

O vigor espermático foi avaliado subjetivamente de acordo com a robustez de movimentação celular, atribuindo-se um escore de zero a cinco, em função da velocidade e progressão de movimento dos espermatozoides, de modo que, quando todos os espermatozoides se apresentam imóveis, atribui-se o vigor de zero, ao passo que, quando os espermatozoides apresentavam rápida movimentação e progressão contínua, atribui-se o vigor de cinco.

O experimento foi realizado utilizando o modelo de blocos casualizados, sendo tomado como tratamento a época de colheita das amostras e os blocos de cada reprodutor, perfazendo três tratamentos e dez blocos. As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. A variável qualitativa foi submetida ao teste de Friedman. Foi realizada a análise de correlação entre os pares de parâmetros quantitativos avaliados. Foi adotado nível de 0,05 de significância em todos os testes, que foram realizados com o auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2012).

Os resultados dos parâmetros qualitativos e quantitativos avaliados durante a realização do experimento estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis seminais de tambaqui (médias \pm desvio padrão) nas três coletas realizadas e valor de probabilidade da análise de variância.

Table 1. Seminal parameters of tambaqui (mean \pm standard deviation) evaluated in three samples collected and values of probability and ANOVA.

Variável	Coleta			P
	1	2	3	
Volume de sêmen (mL)	8,30 \pm 4,1	8,50 \pm 4,0	6,00 \pm 3,3	0,0685
Motilidade espermática (%)	80,0 \pm 6,7	84,0 \pm 5,2	84,8 \pm 5,3	0,1594
Vigor espermático*	4,1/4,0 \pm 0,3	3,8/4,0 \pm 0,4	4,1/4,0 \pm 0,3	0,3772
Tempo de vida (s)	158,3 \pm 133,7ab	267,8 \pm 78,0 a	98,5 \pm 31,9b	0,0055
Concentração espermática (x10 ⁹) mL ⁻¹)	14,5 \pm 4,2 a	3,70 \pm 1,9 c	8,40 \pm 2,8b	<0,0010

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

*Teste de Friedman foi utilizado para comparação de médias, os dados apresentados são a média seguida da mediana.

Não foi observada diferença no volume de sêmen, motilidade espermática e vigor espermático durante a época em que foram realizadas as coletas das amostras. Já o tempo de vida dos espermatozoides foi diferente entre os meses de janeiro e fevereiro de 2013, com médias de 267,80 s e 98,47 s, respectivamente, diferença que reflete a qualidade do sêmen dos peixes do presente estudo, uma vez que o tempo de vida é um parâmetro de avaliação da qualidade dos espermatozoides. BILLARD & COSSON (1992), observaram que amostras coletadas no início e ao final da época de reprodução, geralmente não são de boa qualidade, atribuem a baixa qualidade no final do período reprodutivo ao envelhecimento dos espermatozoides nos testículos, o que pode gerar alterações morfológicas, entretanto, outras possíveis causas apontadas são flutuações hormonais, ambiente dependentes e contaminação do sêmen por urina (BILLARD et al. 1995). GALLEGO et al. (2017) traz novas informações, sugerindo que a proporção de subpopulações espermáticas presentes no ejaculado também pode ser fonte de alterações na qualidade do sêmen.

A fertilização dos gametas ocorre rapidamente, geralmente em períodos menores de um minuto, porém resultados de pesquisas que avaliam o tempo de viabilidade dos espermatozoides são difíceis de serem comparados, pois alguns autores consideram a perda de motilidade baseado em diferentes porcentagens de espermatozoides móveis. Para jundiá cinza, após 35 s de ativação somente 25,59% dos espermatozoides apresentavam motilidade (SANCHES et al. 2010), assim como para dourado, em que a motilidade dos espermatozoides variou entre 30 e 40 s (SANCHES et al. 2009), e tempo de vida de espermatozoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de 50,3 s (STREIT JÚNIOR et al. 2006).

A concentração espermática variou durante o período de coleta, sendo que as amostras coletadas no mês de dezembro de 2012 (primeira coleta realizada) apresentaram maior concentração média de

espermatozoides ($14,54 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$), seguida pela média das amostras do mês de fevereiro de 2013 ($8,36 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$) e janeiro de 2013 ($3,73 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$).

As médias da concentração de espermatozoides foram menores que as descritas por VIEIRA et al. (2011) que encontraram uma concentração média de $22,93 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ de ejaculado de reprodutores de tambaqui induzidos com hormônio em latitude equatorial. Além disso, os autores recomendam um intervalo de coleta de dois meses entre as induções hormonais, para que as reservas de espermatozoides sejam restabelecidas.

PIRES et al. (2017) não observaram diferença significativa entre coletas com intervalos de 64 e 86 dias para os valores de concentração espermática, que foram todos relativamente menores que os encontrados neste trabalho. As diferenças podem ter ocorrido devido à diferença de metodologia de reprodução induzida utilizada, conforme menciona o autor, que variam na literatura desde uma única dose hormonal de 1,0 mg/kg até 2,5 mg/kg (em dose única ou consecutivas de 2,0 mg/kg seguida de duas doses de 0,25 mg/kg).

A média das amostras coletadas no mês de janeiro apresentou redução significativa da concentração de espermatozoides, isso pode ser devido ao fato de que anteriormente à data de coleta houve um período de estiagem de dias, o que não ocorreu nas outras coletas e pode ter contribuído para a menor produção de espermatozoides pelos reprodutores nesta data. Isto pode ter acontecido devido às espécies reofílicas terem sua reprodução influenciada diretamente pelo ambiente, principalmente pelo regime de chuvas, fotoperíodo, temperatura, nutrição e ciclo lunar (MYLONAS et al. 2017). Essas mudanças afetam a quantidade e qualidade de alimento disponíveis em função da época do ano, já que as planícies de inundação nos períodos de chuva se tornam ambientes ricos em alimento e abrigo, por este motivo, os desovadores totais tropicais, como é o caso do tambaqui, iniciam o período reprodutivo principalmente nos períodos de cheia, para que as larvas encontrem maior abundância de alimento e apresentem altas taxas de sobrevivência (GOMES et al. 2010).

Além disso, para machos o processo de gametogênese é dividido em duas fases: a primeira, denominada de espermatogênese, inclui a proliferação de espermatogonia, multiplicação de espermatócitos I por mitose, produção de espermatócitos II por meiose e diferenciação em espermátides, sendo essa fase finalizada quando ocorre a espermiogênese, que é a formação dos espermatozoides flagelados. Na segunda fase, denominada espermição, os espermatozoides são liberados nos ductos espermáticos, que ocorre durante o período reprodutivo (MYLONAS et al. 2010).

A maioria dos métodos de indução utilizados para realizar a reprodução artificial em aquicultura não induz a espermatogênese, que é um longo processo que pode durar dias ou semanas, mas principalmente induz a espermição, de maneira que a indução é realizada para estimular a produção de fluido seminal e aumentar a quantidade de espermatozoides liberados pelo reprodutor (MYLONAS et al. 2010). Dessa forma, é possível que o volume de sêmen seja maior e a concentração de espermatozoides seja menor, pois a formação dos espermatozoides não é estimulada pela indução hormonal e sim por fatores ambientais.

Durante o período reprodutivo do tambaqui, houveram mudanças na concentração de espermatozoides, que diminuiu em relação à primeira coleta, e mudanças no tempo de vida dos espermatozoides, que foi menor no final do experimento em relação à coleta imediatamente anterior. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o uso repetido de reprodutores durante um mesmo período reprodutivo, em intervalo de trinta dias, pode ser realizado sem prejuízos significativos à reprodução apesar das alterações, desde que se respeite a devida proporção entre espermatozoide e ovócito recomendada por LEITE et al. (2013). Novos estudos são necessários para quantificar a influência do ambiente sobre os parâmetros avaliados, e a presença de subpopulações espermáticas no ejaculado.

REFERÊNCIAS

- BILLARD R & COSSON MP. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology* 261: 122-131.
- BILLARD R et al. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129: 95-112.
- GALLEGO V et al. 2017. Fish sperm sub populations: Changes after cryo preservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 87: 16-24.
- GOES MD et al. 2017. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: Reproductive parameters and genetic variability of offspring. *Theriogenology* 88: 254-263.
- GOMES LC et al. 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTO B & GOMES LV (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2.ed. Santa Maria: UFSM. p.175-204.
- LAHNSTEINER F. 2003. Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatid ducts in marine fish.

- Tissue Cell 35: 363-373.
- LEITE LV et al. 2013. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 65: 421-429.
- MARIA AN et al. 2010. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui (*Colossoma macropomum*). Journal of Applied Ichthyology 26: 779-783.
- MARTINS EFF et al. 2017. Ovipel and carp pituitary extract for the reproductive induction of *Colossoma macropomum* males. Theriogenology 98: 57-61.
- MYLONAS CC et al. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology 165: 516-534.
- MYLONAS CC et al. 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. Aquaculture 472: 21-44.
- PIRES LB et al. 2017. Semen characteristics of *Colossoma macropomum* from three successive sample collections in the same reproductive cycle. Aquaculture Research 48: 5104-5110.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2012. R: A language and environment for statistical computing [online]. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 30 mar. 2012.
- ROMAGOSA E et al. 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. Journal of Applied Ichthyology 26: 678-681.
- SALMITO-VANDERLEY CSB et al. 2015. Conservação de gametas e embriões de peixes teleósteos. Revista Brasileira de Reprodução Animal 39: 184-188.
- SANCHES EA et al. 2009. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. Revista Brasileira de Zootecnia 38: 2091-2098.
- SANCHES EA et al. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer assisted analysis by open-source software. Aquaculture Research 42: 153-156.
- SHULZ RW et al. 2010. Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrinology 165: 390-411.
- STREIT JÚNIOR DP et al. 2006. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. Bioscience Journal 22: 119-125.
- VIEIRA MJAF et al. 2011. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. Archivos de Zootecnia 60: 1263-1270.