

# Subpopulações espermáticas de tambaqui e sua correlação com a fertilidade

*Danillo dos Santos Santana<sup>1</sup>, Sidney Sales Cavalcante<sup>2</sup>, Paulo César Falanghe Carneiro<sup>3</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>4</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>5</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>6</sup>*

## Resumo

A análise de subpopulações espermáticas é uma abordagem relativamente nova que consiste na avaliação da coexistência de diferentes espermatozoides agrupados por similaridade. Essa caracterização permite explorar a heterogeneidade dos espermatozoides existentes em uma amostra seminal, de forma que seja revelado o seu potencial de fertilidade. O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas no sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) quanto à cinética e avaliar sua correlação com a fertilidade. Foram avaliados 5.375 espermatozoides do sêmen in natura de 15 peixes por meio da análise em sistema computadorizado (CASA). Os dados de cinética espermática gerados foram tabulados, analisados, relativizados e avaliados pelo método de análise de agrupamento two-step cluster. Esses procedimentos permitiu a identificação de três subpopulações espermáticas no sêmen in natura de tambaqui, sendo duas delas, altamente correlacionadas com a fertilidade. A subpopulação 1 apresentou baixos valores de velocidade curvilínea – VCL: 52,65  $\mu\text{m/s}$ , linearidade – LIN: 19,53%, retilinearidade – STR: 35,64% e da frequência de batimento flagelar – BCF: 5,74 Hz caracterizando os espermatozoides desta subpopulação como lentos, não lineares e não progressivos, onde não foi

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>2</sup> Graduado em Engenheiro de Pesca, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>3</sup> Graduado em Agronomia, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup> Graduado em Zootecnia, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Graduado em Zootecnia, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

observada correlação significativa com a fertilidade ( $r = 0,28$ ). A subpopulação 2, apresentou espermatozoides que foram classificados como rápidos, não lineares, não progressivos e com alta frequência de batimento flagelar (VCL:  $109,72 \mu\text{m/s}$ , LIN:  $53,78\%$ , STR:  $62,90\%$  e BCF:  $19,03 \text{ Hz}$ ), sendo observada alta correlação positiva com a fertilidade ( $r = 0,93$ ). Já a subpopulação 3, apresentou espermatozoides que foram classificados como rápidos, lineares, progressivos e com alta frequência de batimento flagelar (VCL:  $147,27 \mu\text{m/s}$ , LIN:  $84,93\%$ , STR:  $88,88\%$  e BCF:  $26,15 \text{ Hz}$ ), sendo observada também alta correlação positiva com a fertilidade ( $r = 0,79$ ). Conclui-se que o sêmen de tambaqui possui três subpopulações espermáticas caracterizadas pelo padrão de movimento, sendo duas delas, representadas por espermatozoides rápidos, diretamente relacionados com a fertilidade.

**Palavras-chave:** peixe, sêmen, cinética espermática, fertilização.

## Introdução

A análise de subpopulações espermáticas é uma abordagem que consiste na avaliação da coexistência de diferentes espermatozoides agrupados por similaridade. Porém, para que se evidenciem as peculiaridades existentes nos grupos, faz-se necessária a interpretação dos parâmetros em equipamentos precisos a exemplo do sistema de análise espermática assistida por computador (CASA). Esses dados associados a métodos estatísticos multivariados têm auxiliado na identificação de agrupamentos espermáticos no sêmen in natura ou criopreservado de várias espécies de vertebrados (MARTINEZ-PASTOR et al., 2008; DORADO et al., 2010; BRAVO et al., 2011; KANUGA et al., 2012; DORADO et al., 2013; FERRAZ et al., 2014).

A maioria das pesquisas desenvolvidas nas diferentes espécies, a exemplo dos peixes têm-se valido dos valores médios de cinética, tratando a amostra como homogênea. Todavia, com a ênfase dada recentemente ao estudo de subpopulações espermáticas, pode-se concluir que o sêmen é composto por grupos de células heterogêneas as quais podem variar entre espécies (TAHARA et al., 2010) assim como, dentro de um mesmo indivíduo (KANUGA et al., 2012), certamente em consequência das conhecidas diferenças morfológicas e amostrais.

Métodos estatísticos de agrupamento empregados na análise do sêmen de *Solea senegalensis* revelaram quatro subpopulações espermáticas com diferentes padrões de movimento (MARTINEZ-PASTOR et al., 2008). Já para *Oncorhynchus mykiss*, foram identificadas três subpopulações espermáticas (KANUGA et al., 2012). A explicação para a existência das subpopulações espermáticas ainda não é consensual no meio científico, entretanto, acredita-se que a manutenção desta heterogeneidade possa ser importante para manter a qualidade seminal (FLORES et al., 2008), pois, sua relação com a capacidade de fertilização (QUINTERO-MORENO et al., 2003) e resistência ao processo de criopreservação (MUIÑO et al., 2008), tem se mostrado relevante.

O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar as subpopulações espermáticas no sêmen in natura de tambaqui quanto à cinética e avaliar sua correlação com a fertilidade.

## Material e Métodos

A atividade de coleta e avaliação dos gametas foi realizada no Laboratório de Reprodução da Estação de Piscicultura Santa Clara, localizada no Município de Propriá, e no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situada em Aracaju, ambos em Sergipe.

Amostras de sêmen de 15 machos e ovócitos de uma fêmea de tambaqui, *Colossoma macropomum*, ambos sexualmente maduros foram utilizados. Os machos foram selecionados através de leve pressão abdominal em resposta a liberação de sêmen, e para a fêmea utilizada nos ensaios de fertilização considerou-se as características externas tais como: ventre abaulado, poro genital dilatado e vascularizado. Os animais selecionados foram separados e transferidos para viveiros de alvenaria com água corrente à temperatura entre 28° e 30°C, sendo eles induzidos através do método de hipofisação, utilizado o extrato bruto de hipófise de carpa (2 mg de EBHC/kg do peso corporal) via intramuscular. Aproximadamente 10 horas após a hipofisação, o sêmen foi coletado em tubos de ensaio por massagem abdominal, tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação por fezes, urina ou água. Após a coleta do sêmen, uma alíquota de 2  $\mu$ l de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina e observada sob um microscópio óptico (400X), sendo descartadas as amostras que apresentavam pré-ativação. Nas amostras

que não apresentaram contaminação, a taxa de motilidade espermática inicial (expressa em porcentagem de espermatozoides móveis), foi estimada subjetivamente, imediatamente após a adição de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de bicarbonato de sódio 230 mOsm. O volume seminal foi aferido em tubos de ensaio graduados e a concentração espermática de cada amostra de sêmen foi determinada em câmara de Neubauer. Os parâmetros de qualidade espermática mensurados no presente estudo foram conduzidos à temperatura ambiente sempre por um mesmo avaliador. A avaliação computadorizada dos parâmetros de cinética espermática, alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  do sêmen in natura de cada amostra foram transferidas para microtubos e ativadas com 500  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de sódio a 230 mOsm. Imediatamente após a ativação, 3  $\mu\text{L}$  de sêmen diluído foram transferidos para uma câmara de Makler<sup>®</sup> (profundidade 10 $\mu\text{m}$ ) previamente posicionada no microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse 50i<sup>®</sup>, Japão). O microscópio, acoplado a uma câmara de vídeo (Basler Vision Technologies<sup>®</sup> 602FC, Ahrensburg, Alemanha), gerou 100 quadros/s-1. A gravação do vídeo foi iniciada 10 segundos pós-ativação. As imagens (n=50) foram analisadas usando a configuração padrão para peixes do software Sperm Class Analyzer (SCA<sup>®</sup>, Microptics, Versão 5.1 SL, Barcelona, Espanha). Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram: velocidade curvilínea (VCL); velocidade em linha reta (VSL); velocidade do trajeto médio (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); índice de oscilação dos espermatozoides (WOB); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH); frequência do batimento flagelar (BCF) e; motilidade espermática total (MT). Foram analisados aproximadamente 300 espermatozoides/campo, sendo que os espermatozoides que apresentaram VCL menor que 20  $\mu\text{m/s}$  foram considerados imóveis. Para avaliar a capacidade de fertilização do sêmen, uma fêmea foi selecionada e submetida ao processo de indução hormonal da desova por meio da aplicação de duas injeções intramusculares de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) nas doses de 0,5 mg e 5 mg por quilo de peso corporal, com intervalo de 12 horas entre as aplicações. Os ovócitos foram coletados por massagem abdominal, dez horas após a segunda aplicação, e armazenados em recipiente plástico. Posteriormente, os ovócitos foram subdivididos em 15 amostras homogêneas contendo 0,5 g (600 ovócitos) nas quais foram adicionadas alíquotas de sêmen na proporção de 2,5 x 105 espermatozoides por ovócitos. A fertilização foi iniciada após a adição de 5 ml de bicarbonato de sódio a 230 mOsm, sendo a amostra homogeneizada durante dois minutos. Após a fertilização os presumidos zigotos foram transferidos

para incubadoras cilíndricas de PVC com fundo telado (15 cm de altura x 10 de diâmetro; volume útil aproximado de 1 L) acopladas a um sistema de fluxo contínuo de água. A taxa de fertilização foi determinada após oito horas da fertilização por meio da contagem de ovos fecundados num estereomicroscópio (ZEISS STEMI 200-2, Alemanha) e expressa em porcentagem de ovos fertilizados (fechamento do blastóporo) sobre o número total de ovos.

Os dados obtidos a partir dos oito parâmetros de cinética espermática reportados pelo software SCA® foram tabulados, relativizados e analisados pelo método de agrupamento two-step cluster. Para o ensaio de fertilização, foram realizados o teste de correlação de Pearson ( $p < 0,01$ ) e uma análise de regressão para avaliar a relação entre o percentual de subpopulações espermáticas de cada animal ( $n = 15$ ) e sua taxa de fertilização.

## Resultados e Discussão

Três subpopulações espermáticas foram identificadas após a análise realizada em 5375 espermatozoides móveis no sêmen in natura de tambaqui. A subpopulação 1 (SP1) foi a menos abundante e correspondeu a 25,0% do total de espermatozoides analisados. A presença de valores baixos de VCL, LIN, STR e BCF (Tabela 1), caracterizaram os espermatozoides como lentos, não lineares, não progressivos e com baixa frequência de batimento flagelar. A subpopulação 2 (SP2), representou 31,4% do total de espermatozoides analisados, caracterizando-se como rápidos, não lineares, não progressivos e com alta frequência de batimento flagelar, a partir da análise dos valores de VCL LIN, STR e BCF. A subpopulação 3 (SP3), apresentou maior número de espermatozoides, e gerou um percentual correspondente a 43,6% do total analisado. Os espermatozoides foram classificados como rápidos, lineares, progressivos e com alta frequência de batimento flagelar baseados nos elevados valores encontrados para VCL, LIN, STR e BCF.

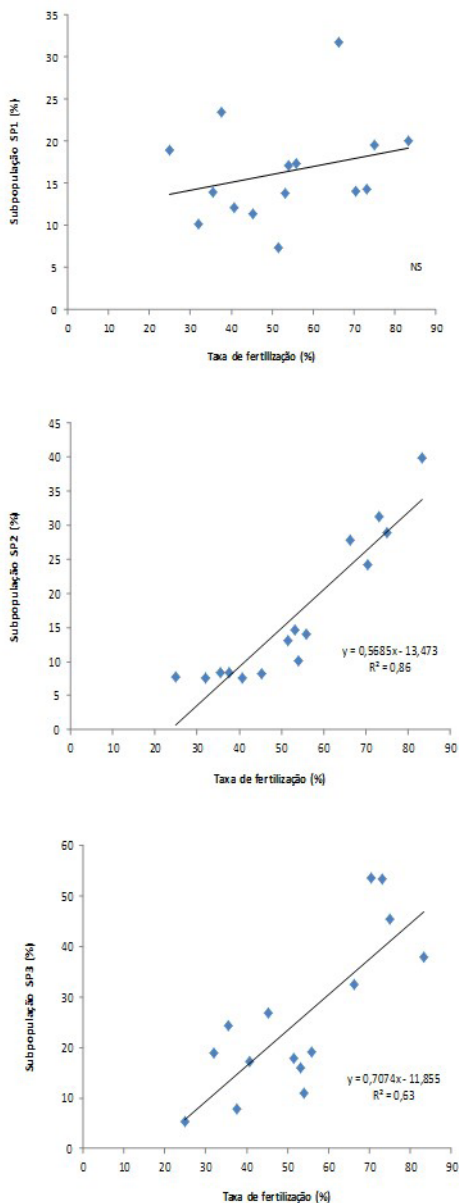
Relatos de que a presença das subpopulações espermáticas pode ser originária da espermatogênese e que suas alterações são supostamente decorrentes da maturação dos espermatozoides também têm sido abordada em alguns trabalhos (KANUGA et al., 2012; BEIRÃO et al., 2009). Outros autores acreditam que essa variação pode ser ainda maior em reprodutores utilizados na piscicultura, pois os métodos de coleta de gametas podem implicar na liberação de espermatozoides imaturos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2008).

**Tabela 1.** Caracterização da cinética das subpopulações espermáticas do sêmen in natura de 15 machos de tambaqui *Colossoma macropomum* utilizados na fertilização (n = 5.375).

Parâmetros	Subpopulação Espermática (SP)		
	SP1 (n = 1.349)	SP2 (n = 1.684)	SP3 (n = 2.342)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<b>VCL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	52,65 ± 22,38	109,72 ± 42,16	147,27 ± 27,48
<b>VSL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	10,16 ± 7,83	54,59 ± 20,89	124,86 ± 25,68
<b>VAP (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	29,78 ± 16,23	93,85 ± 37,64	140,36 ± 25,69
<b>LIN (%)</b>	19,53 ± 13,20	53,78 ± 18,67	84,93 ± 8,56
<b>STR (%)</b>	35,64 ± 21,22	62,90 ± 20,42	88,88 ± 6,97
<b>WOB (%)</b>	56,13 ± 18,46	85,55 ± 10,30	95,38 ± 4,28
<b>ALH (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	1,06 ± 0,36	1,45 ± 0,36	1,33 ± 0,24
<b>BCF (Hz)</b>	5,74 ± 4,16	19,03 ± 8,35	26,15 ± 8,94

VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade do trajeto médio; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação dos espermatozoides; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência do batimento flagelar; DP: desvio padrão; n: células móveis.

Embora a explicação para a existência das subpopulações espermáticas ainda não esteja bem definida, pesquisas vêm demonstrando que a presença de determinadas subpopulações existentes no sêmen possuem alta correlação significativa com a fertilidade (QUINTERO-MORENO et al., 2003) e com a qualidade seminal (FERRAZ et al., 2014; FLORES et al., 2008), fatores esses corroborados no presente estudo, onde foi observada alta correlação significativa entre as subpopulações SP2 e SP3 e a taxa de fertilização (Figura 1;  $r = 0,93$  e  $0,79$ , respectivamente). No entanto, não foi observada correlação significativa entre a SP1 e a taxa de fertilização ( $r = 0,28$ ).



**Figura 1.** Correlação entre as subpopulações espermáticas (SP) e a taxa de fertilização obtidas com o sêmen in natura de tambaqui. Subpopulações 1 (SP1), 2 (SP2) e 3 (SP3). NS = não significativo.

## Conclusão

O sêmen de tambaqui possui três subpopulações espermáticas caracterizadas cineticamente, sendo duas delas, representadas por espermatozoides rápidos, diretamente relacionados com a fertilidade. Quanto maior a presença e a quantidade de subpopulações que contenham espermatozoides com movimentos rápidos, mais elevada é a capacidade de fertilização do macho.

## Referências

- BEIRÃO, J.; SOARES, F.; HERRÁEZ, M. P.; DINIS, M. T.; CARITA, E. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theriogenology*, v. 72, p. 1251-1261, 2009.
- DORADO, J.; MOLINA, I.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology*, v. 74, p. 795-804, 2010.
- DORADO, J.; ACHA, D.; GÁLVEZ, M. J.; ORTIZ, I.; CARRASCO, J. J.; DÍAZ, B.; GÓMEZ-ARRONES V.; CALERO-CARRETERO, R.; HIDALGO, M. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology*, v. 79, p. 1100-1109, 2013.
- FERRAZ, M. A. M. M.; MORATÓ, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PEÑA, A. I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; MUINÓ, R.; MOGAS, T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, v. 81, p. 1067-1072, 2014.
- FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M. M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, v. 70, p. 936-945, 2008.
- KANUGA, M. K.; DREW, R. E.; WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, v. 77, p. 916-925, 2012.



MARTINEZ-PASTOR, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L.; DINIS, M. T. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. **Reproduction**, v. 135, p. 449-459, 2008.

MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; PEÑA, A. I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 27-39, 2008.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A. T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

TAHARA, D.; HATANO, R.; IWATANI, H.; KOYA, Y.; HAYAKAWA, H. Annual changes in testicular development and occurrence of parasperm in the male reproductive organs of fourspine sculpin, *Cottus kazika*. **Ichthyological Research**, v. 57, p. 62-70, 2010.