

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA

MAURÍCIO SPAGNOLO ADAMES

Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose
como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*

TOLEDO

2014

MAURÍCIO SPAGNOLO ADAMES

Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose
como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

TOLEDO

2014

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

A197o Adames, Maurício Spagnolo
Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen* / Maurício Spagnolo Adames. -- Toledo, PR : [s. n.], 2014. 35 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Jundiá (*Rhamdia quelen*) – Reprodução 2 Jundiá (*Rhamdia quelen*) - Motilidade espermática 3. Jundiá (*Rhamdia quelen*) - Fertilização e eclosão 4. Peixes – Fertilização artificial 5. Reprodução animal – Peixes 6. Inseminação artificial animal 7. Sêmen - Criopreservação I. Bombardelli, Robie Allan, orient II. T

CDD 20. ed. 639.3752
597.52

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAURÍCIO SPAGNOLO ADAMES

Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose
como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof.ª Dr.ª Lillian Carolina Rosa da Silva
Universidade Federal do Paraná

Aprovada em: 31 de março de 2014.

Local de defesa: Auditório do Gerpel – Unioeste/Campus de Toledo.

Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da frutose como modulador do movimento espermático sobre a otimização da relação espermatozoide:ovócito em procedimentos de reprodução artificial com o uso do sêmen do *Rhamdia quelen* criopreservado. Através do *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) foram avaliadas em quatro réplicas a motilidade, a velocidade e o tempo de duração da ativação espermática do sêmen criopreservado após o descongelamento (10 segundos após a ativação) em seis soluções ativadoras contendo frutose na concentração de 0,0; 0,9; 1,8; 2,7; 3,6 e 4,5%. Para o ensaio de fertilização foi aplicado um delineamento experimental em esquema fatorial (5 x 6) composto de cinco relações espermatozoides:ovócito (1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 , 7×10^4 e 9×10^4), seis soluções ativadoras contendo frutose (0; 0,9; 1,8; 2,7; 3,6 e 4,5%) e três réplicas ou blocos experimentais (“pools” de ovócitos provenientes de três grupos fêmeas). Os efeitos foram avaliados sobre as taxas de fertilização, eclosão e normalidade larval. Na avaliação das variáveis espermáticas, a análise de regressão mostrou efeito ($p < 0,05$) das soluções na motilidade, velocidade e tempo de duração da ativação espermática. Também foi verificado efeito ($p < 0,05$) no índice obtido pelo agrupamento destas variáveis, denominado de índice de movimento espermático, com resultados de máximo desempenho teórico quando empregado 2,85% de frutose na solução ativadora. No ensaio de fertilização a análise de superfície de resposta mostrou efeito interativo ($p < 0,05$) entre a relação espermatozoides:ovócito e as concentrações de frutose das soluções ativadoras, sobre as taxas de fertilização e de eclosão e do índice de agrupamento das duas variáveis denominado índice de sucesso reprodutivo. De acordo com o modelo estatístico a relação espermatozoides:ovócito foi reduzida mantendo-se as taxas de fertilização e eclosão. A inclusão de frutose nas soluções ativadoras promoveu níveis máximos teóricos semelhantes para fertilização e eclosão quando comparada à fertilização apenas em água destilada, porém com uma economia de 17,77% de espermatozoides móveis. A normalidade larval apresentou efeito ($p < 0,05$) apenas do bloco. Conclui-se que a relação espermatozoides:ovócito pode ser reduzida através do emprego de soluções ativadoras a base de frutose, sem causar prejuízos às taxas de fertilização e eclosão e normalidade larval.

Palavras-chave: Criopreservação. Dose inseminante. Motilidade espermática. Velocidade espermática. Modulador espermático. Espermatozoide.

Optimization of the sperm:oocyte ratio employing fructose as a modulator of sperm movement in *Rhamdia quelen*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of fructose as a modulator of sperm movement on the optimization of the sperm: oocyte in artificial reproduction procedures with the use of cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*. Through the *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) were evaluated in four replicas the motility rates, speed and time of sperm activation of the cryopreserved semen after thawing (10 seconds after activation) into six activating solutions containing fructose, concentrated at 0.0; 0.9; 1.8; 2.7; 3.6 and 4.5%. For the testing of fertilization an factorial experimental design (5 x 6) composed of five sperm:oocyte ratio (1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 , 7×10^4 e 9×10^4), six activating solutions containing fructose (0.0; 0.9; 1.8; 2.7; 3.6 and 4.5%) and three replicas or experimental blocks ("pools" of oocytes from three female groups). The effects were evaluated over variable rates of fertilization, hatching and larval normality. In the evaluation of sperm variables a regression analysis showed effect ($p < 0,05$) of the solutions in motility, speed and duration of sperm activation. It was also verified effect ($p < 0,05$) in the index obtained from clustering of such variables called index of sperm movement, with results of theoretical peak performance when 2.85% of fructose in solutions was employed. In the fertilization assay the analysis of response surface showed interactive effect ($p < 0.05$) between sperm:oocyte ratio and fructose concentrations in activating solutions, on the fertilization and hatching rates and of the clustering index of two variables called index of reproductive success. According to the statistical model, sperm:oocyte ratio can be reduced keeping up the rates of fertilization and hatching. The inclusion of fructose in activating solutions has promoted similar theoretical maximum levels for fertilization and hatching when compared to fertilization only in distilled water, however with a saving of 17.77% of mobile spermatozoa: oocyte. The larval normality showed effect ($p < 0.05$) just for the block. It is concluded that the sperm:oocyte ratio can be reduced through the employment of fructose-based activating solutions, without affecting the fertilization, hatching rates and larval normality.

Keywords: Cryopreservation. Insemination dose. Sperm motility. Sperm velocity. Spermatoc modulator. Sperm.

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas da publicação
científica *Theriogenology*. Disponível em:
<<http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>>*

SUMÁRIO

CAPITULO I	8
<i>Revisão de literatura</i>	8
1. Ativação e motilidade espermática em peixes	9
2. Metabolismo energético do espermatozoide	10
3. Relação espermatozoide:ovócito.....	11
Referências	12
CAPITULO II	15
<i>Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose como modulador do movimento espermático em Rhamdia quelen</i>	15
1. Introdução	16
2. Materiais e Métodos.....	17
2.1. Estrutura e animais experimentais.....	17
2.2. Coleta e avaliação do sêmen fresco.....	17
2.3. Criopreservação e avaliação do sêmen após o descongelamento.....	19
2.3.1. Análises estatísticas.....	20
2.4. Fertilização artificial dos ovócitos com soluções ativadoras contendo frutose.....	20
2.4.1. Análises estatísticas.....	21
3. Resultados	22
3.1. Avaliação do sêmen após o descongelamento e ativação em soluções contendo frutose	22
3.2. Fertilização artificial dos ovócitos com soluções ativadoras contendo frutose.....	23
4. Discussão	29
5. Conclusão.....	32
Referências	32

CAPITULO I

Revisão de literatura

1. Ativação e motilidade espermática em peixes

Nos testículos e no plasma seminal, os espermatozoides de um grande número de espécies de peixes de água doce apresentam-se quiescentes, sendo a motilidade espermática um processo que tem início após o contato das células com o ambiente aquático ou meio ativador (Alavi e Cosson, 2006). Os fatores físicos, químicos e fisiológicos responsáveis pela ativação espermática são variados, podem atuar de maneira isolada ou de forma interativa, e dependem da espécie e do meio em que esta habita (Valdebenito *et al.*, 2009). Dentre os fatores que causam despolarização da membrana celular e estimulam o início do movimento espermático, merecem destaque o pH, a composição iônica do meio ativador, e a variação dos níveis osmóticos entre o plasma seminal e o meio ativador (Coward *et al.*, 2002; Martínez e Carrasco, 2010).

Em determinadas espécies, a exemplo da truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), do salmão (*Salmo salar*), do esturjão (*Acipenser ruthenus*) e do peixe-espátula (*Polyodon spathula*), a ativação espermática é dependente da ação do íon K^+ e de antagonistas como Na^+ e o Ca^{2+} (Cosson, 2004; Alavi e Cosson, 2006). No entanto para outras espécies como a carpa (*Cyprinus carpio*) e o turbot (*Scophthalmus maximus*) a diferença de osmolaridade entre o plasma seminal e o meio ativador, independente da concentração de íons, é o principal desencadeador da ativação espermática (Morisawa *et al.*, 1983; Chauvaud *et al.*, 1995).

Outros fatores físicos e químicos, como pH, temperatura e presença de íons nos meios ativadores apesar de não atuarem como principais desencadeadores da motilidade espermática em determinadas espécies, podem contribuir no tempo de duração e vigor da motilidade espermática (Cosson, 2004). De maneira semelhante em diversas outras espécies de peixes soluções que prolongam o tempo de duração e a velocidade dos espermatozoides vêm sendo testadas, a exemplo de soluções como o fluido ovariano na ativação de espermatozoides em salmonídeos (Woolsey *et al.*, 2006, Butts *et al.*, 2012) ou de soluções salinas contendo bicarbonato de sódio, NaCl e KCl (Murgas *et al.*, 2007), além de soluções contendo cafeína para a truta (*O. mykiss*) (Valdebenito *et al.*, 2007) ou frutose para o surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*) (Neumann, 2012).

Em função de a motilidade espermática ser considerada uma das principais variáveis relacionadas à qualidade do sêmen em peixes (Kime *et al.*, 2001), e estar diretamente correlacionada à fertilização (Rurangawa *et al.*, 2004) soluções capazes de prolongar a duração do tempo de ativação e as taxas de motilidade são fundamentais em procedimentos de fertilização artificial, possibilitando maiores taxas de fertilização e melhor desempenho reprodutivo (Gallego *et al.*, 2013).

2. Metabolismo energético do espermatozoide

Enquanto permanecem imóveis nos testículos, os espermatozoides de peixes apresentam metabolismo energético basal caracterizado por baixo consumo de oxigênio, apenas para a manutenção de trocas iônicas na membrana plasmática e para o armazenamento de estoques de ATP nas mitocôndrias, porém quando expostos ao meio aquático ou a um meio ativador adequado, iniciam movimento flagelar (Bobe e Labbé, 2010).

As principais fontes de energia para o espermatozoide são provenientes da glicólise, fosforilação oxidativa e ciclo do ácido tricarboxílico, sendo o ATP gerado por estas vias a principal molécula energética. Durante o período de motilidade, a demanda por energia pelo espermatozoide é muito elevada e a atividade da adenilato quinase torna-se intensa para gerar o ATP necessário ao batimento flagelar (Ingermman, 2008). No entanto, o consumo energético é maior do que a capacidade de produção de energia pela célula, o que resulta em uma rápida depleção dos níveis intracelulares de ATP e reflete na curta duração da motilidade espermática (Burness *et al.*, 2005)

Apesar do ATP acumulado durante a capacitação espermática desempenhar o principal papel no fornecimento de energia para as células espermáticas, estudos demonstraram que durante o movimento espermático, nutrientes internos como frutose, glicose e galactose podem contribuir para o metabolismo do ATP e fornecimento de energia às células em determinadas espécies, como relatado para o escalo (*Leuciscus cephalus*) (Lahnsteiner *et al.*, 1992) e a dourada (*Sparus aurata*) (Lahnsteiner *et al.*, 2012). Por outro lado, precursores metabólicos presentes em substratos exógenos também podem ser incorporados como é o caso do piruvato, lactato, glioxilato e em menor grau a glicose (Bobe e Labbé, 2010 ; Ingermman *et al.*, 2011).

Contudo, a capacidade das células espermática de metabolizar substratos energéticos exógenos é um fator espécie-específico (Boryshpolets *et al.*, 2009) e está relacionada às estratégias reprodutivas. Espécies de fertilização interna são capazes de metabolizar substratos exógenos devido a presença de substâncias metabólicas nos fluidos produzidos pela fêmea, enquanto que em espécies de fertilização externa, a célula espermática geralmente tem dificuldade em metabolizar o substrato extracelular, devido a um metabolismo oxidativo limitado, ou baixa permeabilidade de membrana (Bobe e Labbé, 2010).

Metabólitos como os citados anteriormente podem ocorrer naturalmente nos fluidos ovarianos e no plasma seminal, possuindo a capacidade de prolongar o tempo de ativação espermática em algumas espécies de peixes (Ingermman *et al.*, 2011). Portanto, o emprego destas substâncias em soluções utilizadas em procedimentos de fertilização artificial de ovócitos de peixes podem melhorar a condição das células e consequentemente o sucesso reprodutivo.

3. Relação espermatozoide:ovócito

A relação espermatozoide:ovócito ou dose inseminante ideal, pode ser definida como o número de espermatozoides necessários para fertilizar cada ovócito, representando o máximo sucesso na fertilização (Leite *et al.*, 2013). Essa proporção ideal de gametas é espécie-específica e está relacionada a características como o diâmetro do ovócito, o tempo de duração da motilidade espermática e a distância percorrida pelos espermatozoides até o encontro do ovócito (Billard e Cosson, 1992; Suquet *et al.*, 1995). Estudos de relação espermatozoide:ovócito foram realizados com diversas espécies de peixes teleósteos, incluindo espécies neotropicais como a piabanha (*Brycon insignis*) (Shimoda *et al.*, 2007) o dourado (*Salminus brasiliensis*) (Sanches *et al.*, 2009) o pacu (*Piaractus Mesopotamicus*) (Sanches *et al.*, 2011) e o cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*) (Bombardelli *et al.*, 2013).

Em procedimentos de fertilização artificial, a aplicação do conceito de dose inseminante é fundamental para obter o sucesso das taxas de fertilização, pois o emprego de um número excessivo de espermatozoides nestes procedimentos pode induzir à polispermia e/ou competição entre os espermatozoides (Kwantong e Bart, 2009). Além disso, o emprego de reduzidas doses inseminantes ou relações espermatozoides:ovócito pode reduzir a probabilidade de encontro de gametas, e da mesma forma prejudicar o processo de fertilização artificial (Shimoda *et al.*, 2007).

Outro aspecto relevante da utilização de uma correta relação espermatozoide:ovócito reflete sobre a otimização da eficiência reprodutiva em procedimentos de fertilização artificial (Gallego *et al.*, 2013), uma vez que através da aplicação do número exato de espermatozoides necessários para fertilizar determinada massa de ovócitos é possível reduzir o número de machos e os custos com a manutenção de grandes estoques de reprodutores (Bombardelli *et al.*, 2006; Felizardo *et al.*, 2010).

Além disso, do ponto de vista da consolidação do uso de sêmen criopreservado em escala de comercial/industrial, a aplicação da relação espermatozoide:ovócito é essencial também devido a redução nas taxas de motilidade espermática do sêmen descongelado e da necessidade de correção da proporção de gametas em termos de células espermáticas móveis ou capazes de realizar a fertilização.

Apesar de determinadas espécies possuírem a relação espermatozoide:ovócito definida como é o caso do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Bombardelli *et al.*, 2006), procedimentos capazes de gerar reduções na relação espermatozoide:ovócito, sem prejuízos às taxas de fertilização devem ser avaliados com o objetivo de promover um aperfeiçoamento das técnicas de fertilização artificial e a racionalização no uso de gametas.

Referências

- Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell biol int* 2006;30:1–14.
- Billard R, Cosson, MP. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool* 1992;261:22–31.
- Billard R, Marcel J, Matei D. Survive post mortem des gametes de truite fario, *Salmo trutta fario*. *Can J of Zoo* 1980;59:29–33.
- Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010;165(3):535–48.
- Bombardelli RA, Mörschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA, Syperreck MA. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *R Bras Zootec* 2006;35(4):1251–257.
- Bombardelli RA, Sanches EA, Baggio DM, Sykora RM, Souza BS, Tessaro L, Piana PA. Effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume and water temperature on artificial fertilization and sperm activation of cascudo-preto. *R Bras Zootec* 2013;42(1):1–6.
- Boryshpolets S, Dzyuba B, Stejskal V, Linhart O. Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality. *Theriogenology* 2009;72:851–59.
- Burness G, Moyes CD, Montgomerie R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Comp biochem physiol Part A* 2005;140(1):11–17.
- Butts IAE, Johnson K, Wilson CW, Pitcher TE. Ovarian fluid enhances sperm velocity based on relatedness in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Theriogenology* 2012;78:2105–109.
- Chauvaud L, Cosson J, Suquet M, Billard R. Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*, initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. *Environ biol fishes* 1995;43:341–49.
- Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International* 2004;12:69–85.
- Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 2002;12:33–58.
- Felizardo VO, Murgas LDS, Drumond MM, Silva JA. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Rev Ceres* 2010;57(5):648–52.

- Gallego V, Pérez AL, Asturiano JF, Yoshida M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture* 2013;416-417:238–43.
- Ingermann RL. Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. In: Alavi SNH, Cosson J, Coward K, Rafiee G. (Ed.). *Fish spermatology*. Oxford: Alpha Science International 2008:241–67.
- Ingermman RL, Schultz CLF, Kanuga MK, Wilson-Leedy JG. Metabolism of motile zebrafish sperm. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2011;158:461–67.
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister, BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem Physiol* 2001;130:425–33.
- Kwantong S, Bart AN. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). *Aquac res* 2009;40:292–97.
- Lahnsteiner F, Caberlotto S. Motility of gilthead seabream *Sparus aurata* spermatozoa and its relation to temperature, energy metabolism and oxidative stress. *Aquaculture* 2012;307-371:76–83.
- Lahnsteiner F, Patznerl RA, Weismann T. Monosaccharides as energy resources during motility of spermatozoa in *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae, Teleostei). *Fish Physiol and Biochem* 1992;10(4):283–89.
- Leite LV, Melo MAP, Oliveira FCE, Pinheiro JCS, Campello CC, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013;65(2):421–29.
- Mansour N, Lahnsteiner F, Berger B. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comp biochem physiol Part B* 2003;135:285–96.
- Martínez JG, Carrasco SP. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta biol Colomb* 2010;15(2):3–24.
- Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Zool* 1983;107:95–03.
- Murgas LDS, Miliorini AB, Freitas RTF, Pereira GJM. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *R. Bras Zootec* 2007;36(3):526–31.

Neumann G. Frutose como ativador e crioprotetor espermático do Surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*). Monografia – Curso de Engenharia de Pesca – Universidade Estadual do Oeste do Paraná 2012. 38p.

Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 2004;234:1–28.

Sanches EA, Baggio DM, Piana PA, Souza BS, Bombardelli RA. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *R Bras Zootec* 2011;40(1):1–6.

Sanches EA, Bombardelli RA, Baggio DM, Souza BE. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. *R Bras Zootec* 2009;38(11):2091–098.

Shimoda E, Andrade DR, Vidal Júnior MV, Godinho HP, Yasui GS. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007;59(4):877–82.

Suquet M, Billard R, Cosson JC, Normant Y, Fauvel C. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture* 1995;133:83–90.

Valdebenito I, Fletcher C, Vera V, Fernández J. Factores físicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Arch Med Vet* 2009;41:97–06.

Valdebenito NI. Efecto de la Cafeína en la Motilidad y Fertilidad Espermática de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Inf tecnol* 2007;18(2):61–65

Woolsey J, Holcomb M, Cloud J, Ingermann R. Sperm motility in the steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): influence of the composition of the incubation and activation media. *Aquac Res* 2006;37:215–23.

CAPITULO II

Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose
como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*

1. Introdução

A criopreservação de espermatozoides e a criação de bancos de germoplasma podem contribuir para programas de conservação da biodiversidade e/ou melhoramento genético na aquicultura [1]. Apesar da viabilidade experimental das técnicas, atualmente o uso em larga escala ou em escala não experimental do sêmen criopreservado de peixes encontra-se em estágio inicial de desenvolvimento e o seu emprego em nível comercial ainda não tem sido viabilizado [2,3].

As dificuldades relacionadas com a viabilização do emprego do sêmen criopreservado para uso em larga escala estão relacionadas com a inexistência de técnicas que disponibilizem, em único contêiner criogênico, o número mínimo necessário de espermatozoides para garantir o sucesso da fertilização artificial dos ovócitos de uma ou mais fêmeas [4,5].

Apesar de a criopreservação ser uma técnica experimental estabelecida com relativo sucesso em muitas espécies de peixes de clima temperado [6], e em pelo menos 17 espécies neotropicais [3], a perda da viabilidade espermática em decorrência dos danos celulares provocados pelo processo de criopreservação [7] dificulta a consolidação destes bancos genéticos para uso em larga escala. Os danos celulares podem estar associados ao inchaço e a ruptura das células espermáticas, a perda da permeabilidade seletiva da membrana ou a mudança na sua fluidez e ainda redução da atividade enzimática [8]. Estes danos refletem de forma isolada ou combinada sobre a motilidade e a velocidade espermática, levando ao consequente prejuízo sobre a fertilização dos ovócitos e/ou o desenvolvimento embrionário [9,10]. Uma estratégia utilizada para compensar estes problemas e promover a manutenção do sucesso reprodutivo com o uso do sêmen criopreservado, tem sido a prática da correção da proporção espermatozoides móveis:ovócito presente nos contêineres criogênicos. Contudo, nesta prática obrigatoriamente ocorre o aumento do volume seminal utilizado e retorna aos problemas que inviabilizam o uso sêmen criopreservado em larga escala.

Portanto, procedimentos que visem a melhora da fertilidade dos espermatozoides criopreservados por meio da modulação da motilidade espermática após o descongelamento [6] podem ser positivos na busca pela viabilização de técnicas de criopreservação para uso em larga escala do sêmen criopreservado de peixes. A modulação do movimento espermático é um processo que atua sobre as propriedades fisiológicas da célula, melhorando o condicionamento do espermatozoide [6] e consequentemente a sua capacidade de movimento. Pesquisas relacionadas a este tema evidenciaram que a adição de substâncias nas soluções empregadas na ativação espermática após o descongelamento, como a cafeína para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) [11,12] e a frutose para o surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) [13], promovem aumento das taxas de motilidade e de velocidade espermática.

Como a fertilidade dos espermatozoides é diretamente relacionada com os parâmetros de movimento espermático [14] e a viabilidade do uso do sêmen criopreservado depende da correção da dose inseminante com base no percentual de espermatozoides móveis e na velocidade espermática [15], o uso de soluções contendo moduladores do movimento espermático podem contribuir para a viabilização destas técnicas. Estas soluções potencializam o movimento destas células [16] e consequentemente, podem otimizar o uso dos espermatozoides em procedimentos de criopreservação do sêmen, reduzindo o volume de material a ser congelado e também multiplicando o potencial reprodutivo de reprodutores com elevado valor genético [17,18].

Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos da frutose como modulador do movimento espermático e seus efeitos sobre a otimização da relação espermatozoide:ovócito em procedimentos de reprodução artificial com o uso do sêmen criopreservado de *Rhamdia quelen*, um importante modelo biológico e uma espécie neotropical com importância para a aquicultura na América do Sul [19].

2. Materiais e Métodos

2.1. Estrutura e animais experimentais

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), instalado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo, Paraná, Brasil. Foram utilizados 10 machos ($141,37 \pm 62,73\text{g}$) e 24 fêmeas ($250,48 \pm 166,17\text{g}$), previamente estocados em viveiros escavados revestidos de alvenaria e fundo de terra, com área de 200m^2 . Foram selecionadas as fêmeas aptas à reprodução, apresentando abdômen arredondado, papila urogenital saliente de coloração avermelhada e tamanho uniforme dos ovócitos [20,21]. Os machos selecionados apresentavam liberação de sêmen quando submetidos a leve pressão abdominal [18].

2.2. Coleta e avaliação do sêmen fresco

Para a coleta do sêmen, os 10 machos selecionados foram transferidos ao laboratório de reprodução, e individualmente pesados, marcados e acondicionados em tanques de 1.000L instalados em um sistema de recirculação dotado de aeração e controle de temperatura por meio de aquecimento elétrico ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Em seguida, com a finalidade de promover a espermição os machos foram submetidos à manipulação hormonal por meio de aplicação intramuscular de uma dose única de 3mg de extrato pituitário de carpa (EPC).kg de reprodutor⁻¹. A coleta do sêmen foi realizada após o período correspondente a 240 unidades térmicas acumuladas (UTA) (10 horas; água a 24°C), contadas a partir da aplicação hormonal [22].

A coleta dos gametas foi realizada individualmente para cada reprodutor, em tubos de ensaio graduados, por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal. As primeiras parcelas do sêmen liberado foram desprezadas para evitar a possível contaminação com urina, muco, fezes ou água. Imediatamente após a coleta do sêmen, foi analisada a ocorrência de ativação acidental dos espermatozoides (presença ou ausência de espermatozoides móveis no sêmen fresco e não diluído) por meio da visualização subjetiva em microscópio óptico em objetiva de 40X. As amostras que apresentavam espermatozoides móveis foram descartadas.

Após a coleta, o sêmen de todos os machos foi misturado e homogeneizado para formar uma amostra composta ou um “pool” de sêmen (motilidade espermática de 84,73% e velocidade espermática de $48,69\mu\text{m.s}^{-1}$). Imediatamente após a formação do “pool”, o pH seminal foi determinado por meio de método colorimétrico em papel de tornassol (Merck®) [23]. Em seguida, alíquotas do sêmen foram submetidas à centrifugação (Fanem®, Baby® I Centrifuge mod. 206) a 3.500rpm pelo período de 20min, para extração de 2,5ml de plasma seminal que foram conservados a -5°C para posterior determinação da osmolaridade (252mOsm.Kg^{-1}) em osmômetro crioscópico (PLZ, mod. PLZ-1000).

O restante do sêmen coletado foi estocado sob refrigeração ($\pm 12^\circ\text{C}$) durante o período necessário para a realização das demais análises seminais e espermáticas. Os parâmetros de motilidade espermática foram avaliados em quadruplicatas pelo sistema *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), dez segundos após o início da ativação espermática [24]. A ativação espermática foi realizada em tubos tipo *ependorf* (1,5mL), utilizando-se 1 μL de sêmen e 800 μL da solução ativadora (água destilada). Os parâmetros espermáticos avaliados foram: a taxa de motilidade, a velocidade linear, a velocidade curvilínea e a velocidade média de deslocamento. Em função da existência de uma alta correlação, os resultados das três velocidades foram agrupados por meio da análise de componentes principais (PCA), gerando uma nova variável determinada velocidade espermática [22].

Do “pool” de sêmen, uma amostra de 5 μL também foi fixada em 5.000 μL de formol salino tamponado para mensuração da concentração espermática ($2,91 \times 10^{10}$ espermatozóides. mL^{-1}) e do índice de alterações morfológicas ($10,63 \pm 1,84\%$). A concentração espermática foi determinada por meio da contagem das células espermáticas em câmara hematómetrica de *Neubauer* [25]. As análises para determinação do índice de alterações morfológicas foram realizadas em triplicata, diluindo-se em tudo *ependorf* 40 μL do sêmen previamente fixado em 2 μL do corante rosa de bengala. Em seguida 20 μL do sêmen já corado foram depositados sobre uma lâmina, que foi seca ao ar e coberta por uma lamínula para posterior análise em microscópio óptico em objetiva de 40X. Cerca de 300 espermatozoides foram contados e classificados como normais ou anormais [14].

2.3. Criopreservação e avaliação do sêmen após o descongelamento

Durante o processo de criopreservação, amostras do sêmen provenientes do “pool” foram diluídas em uma solução crioprotetora contendo 5% de frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol (pH 6,88, osmolaridade 3.016mOsm.Kg⁻¹) adaptada de [26], na proporção 1:3 (sêmen: solução crioprotetora). Em seguida o sêmen foi imediatamente envasado em palhetes de volume 0,25mL e submetidos ao pré-congelamento em botijão de vapor de nitrogênio pelo período de 18 horas. Em seguida, os palhetes foram transferidos e armazenados em nitrogênio líquido a -196°C. Decorridas 24 horas, o sêmen criopreservado foi submetido ao protocolo de descongelamento pela imersão dos palhetes em água a temperatura ambiente (25°C), por um período de 10 segundos.

Aliquotas do sêmen descongelado foram submetidas à ativação espermática por meio da diluição em soluções a base de água destilada e seis diferentes níveis de frutose (0,0; 0,9; 1,8; 2,7; 3,6 e 4,5%). Para promover a ativação espermática, 10µL de sêmen foram diluídos em 800µL da solução ativadora e homogeneizados em um *epENDORF* de volume útil de 1,5mL. Após a diluição, para cada solução ativadora, foi realizada em quadriplicata a avaliação dos parâmetros de motilidade e velocidade espermática conforme descrito anteriormente, e também do tempo de duração da ativação espermática (tempo correspondente entre o início e o término da ativação espermática). Ainda, devido a forte correlação entre os parâmetros, foi obtido o índice de movimento espermático, gerado pelo agrupamento das variáveis de motilidade, velocidade e tempo de duração da ativação espermática, por meio do protocolo de análise de componentes principais (PCA). Os níveis de frutose empregados nas soluções ativadoras foram definidos com base em ensaios piloto. Também foram mensurados a osmolaridade (osmômetro crioscópico PLZ, mod. PLZ-1000) e o pH (pH-mêtro digital Tecnal®, TEC-5) das soluções ativadoras (Tabela 1).

Tabela 1

Osmolaridade e pH das soluções ativadoras contendo diferentes níveis de frutose.

Solução (% de Frutose)	Osmolaridade (mOsm.Kg ⁻¹)	pH
0	0	7,0
0,9	47	6,50
1,8	96	6,48
2,7	148	6,49
3,6	200	6,51
4,5	254	6,50

Parte do sêmen descongelado também foi fixada em solução de formol salino tamponado para posterior análise do índice de alterações morfológicas (47,65±4,11%) conforme procedimento descrito anteriormente.

2.3.1. Análises estatísticas

Os resultados de taxa de motilidade, velocidade espermática, tempo de duração da ativação espermática e índice de movimento espermático foram analisados pelo protocolo de regressão polinomial do *software* STATISTICA 7.1[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), sob um nível de significância de 5%. Os dados foram ajustados pelos modelos polinomiais de 3ª ordem e os pontos de máximo desempenho teórico em termos de movimento espermático foram obtidos por meio da realização da derivada parcial das equações de predição estabelecidas pelo *software*.

2.4. Fertilização artificial dos ovócitos com soluções ativadoras contendo frutose

Para os ensaios de fertilização artificial dos ovócitos, as fêmeas selecionadas com evidência de maturação gonadal foram acondicionadas em laboratório conforme procedimento descrito anteriormente para os machos. Em seguida, para promover a maturação final e a ovulação, as fêmeas foram submetidas ao protocolo de manipulação hormonal por meio da aplicação de duas doses intramusculares de extrato pituitário de carpa (EPC). A primeira dose foi de 0,5mg de EPC.kg de fêmea⁻¹ e a segunda, administrada 12 horas após a primeira, foi de 5,0mg EPC.kg de fêmea⁻¹. Decorridas 240 UTA (10 horas; água a 24°C), contadas a partir da segunda aplicação hormonal, as fêmeas foram individualmente contidas, secas e submetidas à coleta dos ovócitos por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal [18]. Foram utilizados os gametas provenientes de fêmeas que apresentavam características de uniformidade de tamanho, coloração e ausência de sangue na massa de ovócitos liberada.

Imediatamente após a coleta e constituição do “pool” de ovócitos, a fertilização artificial foi realizada pelo procedimento “a seco” [20], onde 2,0mL de ovócitos (3.151 ± 228 ovócitos) foram misturados ao sêmen descongelado e os gametas ativados com 20mL de solução ativadora. Após este processo os gametas e a solução foram homogeneizados por meio de suave agitação pelo período de 60 segundos. Finalmente, os ovos foram lavados, hidratados e transferidos para as incubadoras experimentais confeccionadas em PVC, com formato funil-cônico e volume útil de 2,5L. Estas incubadoras estavam instaladas em um sistema de recirculação de água, dotado de filtragem mecânica e biológica e controle térmico ($\pm 1,0^\circ\text{C}$) da água por meio de aquecimento elétrico.

Os ensaios de fertilização foram conduzidos em um delineamento experimental em esquema fatorial 5 x 6, com três replicas. Os fatores experimentais foram constituídos por cinco relações espermatozoide:ovócito (1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 , 7×10^4 e 9×10^4 espermatozoides móveis.ovócito⁻¹) e seis soluções ativadoras a base de água destilada, contendo 0,0; 0,9; 1,8; 2,7; 3,6 e 4,5% de frutose. Durante a condução das desovas, os ovócitos provenientes de grupos de oito fêmeas originaram três “pools” de ovócitos, que constituíram os três blocos experimentais (replicas). Foi

considerada como unidade experimental uma incubadora em formato cônico de 2,5L de volume útil, contendo 2,0mL de ovócitos (3.151 ± 228 ovócitos). O número de ovócitos presente em um mililitro proveniente de cada “pool” foi estimado pela contagem de três sub amostras de 0,1mL de ovócitos.

O sêmen utilizado na fertilização dos ovócitos foi proveniente do mesmo “pool” empregado para os ensaios de criopreservação. O procedimento de descongelamento também foi o mesmo descrito anteriormente. Ainda, o volume de sêmen utilizado no procedimento de fertilização artificial foi corrigido para fornecer as diferentes proporções de espermatozoides móveis: ovócito, conforme a equação:

$$VI = \frac{DI}{[SPZ_{fresco}] \times MOT \times FDC} \text{ ou } VI = \frac{(SPZ:OVC) \times (OVC)}{[SPZ_{fresco}] \times MOT \times FDC}$$

VI = Volume inseminante (μ L)

DI = Dose inseminante total (número de espermatozoides)

SPZ:OVC = número de espermatozoides móveis necessário para fertilizar cada ovócito (unidades)

OVC = número de ovócitos na incubadora experimental (unidades)

[SPZ_{fresco}] = concentração espermática no sêmen fresco (espermatozoides.mL de sêmen⁻¹)

MOT = Percentual de espermatozoides móveis após descongelamento (%)

FDC = fator de diluição do sêmen na solução crioprotetora

O efeito dos tratamentos foi observado com base na estimativa das taxas de fertilização e eclosão dos ovos e no percentual de normalidade larval. A mensuração das taxas de fertilização artificial foi realizada após o fechamento do blastóporo do embrião, aproximadamente 12 após a fertilização [27], por meio da contagem de três sub amostras de cada unidade experimental com aproximadamente 135 ovos.

Após o término da eclosão dos ovos (± 1057 UTA ou 47,5 horas; água a 22,25°C), todas as larvas foram fixadas em solução de formalina a 4%, tamponada com carbonato de cálcio. A partir das larvas fixadas foi determinada a taxa de normalidade larval, por meio da contagem e classificação em microscópio estereoscópico (10X) de 300 indivíduos. Foram consideradas como larvas normais aquelas que não apresentavam nenhum tipo de alteração na coluna vertebral, saco vitelínico ou cabeça [28]. Pela contagem de todas as larvas fixadas foi determinada também a taxa de eclosão em cada unidade experimental.

2.4.1. Análises estatísticas

O efeito dos tratamentos sobre as taxas de fertilização, eclosão e normalidade larval, foi avaliado pelo protocolo de superfície de resposta do *software* STATISTICA 7.1[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os parâmetros não significativos ($p > 0,05$) foram removidos progressivamente

nos termos de ordens superiores pelo método *backward stepwise*. Devido a uma alta correlação entre as variáveis taxa de fertilização e taxa de eclosão, essas foram agrupadas pelo protocolo de análise de componentes principais (PCA), gerando o índice de sucesso reprodutivo, que também foi avaliado pela análise de superfície de resposta.

Em caso de efeito significativo dos modelos de superfície de resposta, realizou-se a plotagem dos gráficos de contorno em duas e três dimensões. Acima dos gráficos, foi plotada também a linha de máximo desempenho teórico, obtida através das derivadas parciais [29] do modelo estatístico em relação às variáveis significativas. Foram checados também, sobre os resíduos do modelo, os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias.

Como a correção da dose inseminante implicou no emprego de diferentes volumes de sêmen e consequentemente em diferentes fatores de diluição durante os procedimentos de fertilização artificial, foram checados os efeitos da diluição como variável omitida, com a finalidade de verificar se a variação nas diluições durante a ativação espermática apresentou diferença entre as unidades experimentais. Para tanto, uma análise de regressão entre os resíduos do modelo de superfície de resposta e as diferentes diluições aplicadas na ativação espermática em cada unidade experimental foi realizada através do *software* STATISTICA 7.1[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), sob um nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Avaliação do sêmen após o descongelamento e a ativação espermática em soluções contendo frutose

Os níveis de frutose nas soluções ativadoras interferiram ($p < 0,05$) sobre o processo de ativação espermática (Fig. 1). O percentual de espermatozoides móveis apresentou um ajuste polinomial de 3ª ordem ($p < 0,05$) em relação ao aumento dos níveis de frutose nas soluções ativadoras, com máxima ativação espermática teórica de 48,57% quando empregado um nível de 1,98% de frutose na solução ativadora (Fig. 1A).

A velocidade espermática e o tempo de duração da motilidade espermática também sofreram efeito dos tratamentos ($p < 0,05$) (Fig. 1B; Fig. 1C). Neste caso, a máxima velocidade espermática teórica ($60,70 \mu\text{m.s}^{-1}$) foi obtida quando empregado 3,27% de frutose na solução ativadora (Fig. 1B), enquanto que o maior tempo teórico de duração da ativação espermática foi 79,97s, quando utilizado 2,96% de frutose na solução ativadora (Fig. 1C).

Quando as variáveis foram agrupadas, também foi evidenciado efeito dos tratamentos ($p < 0,05$), com maior índice de movimento espermático teórico para o emprego de uma solução contendo 2,85% de frutose (Fig. 1D).

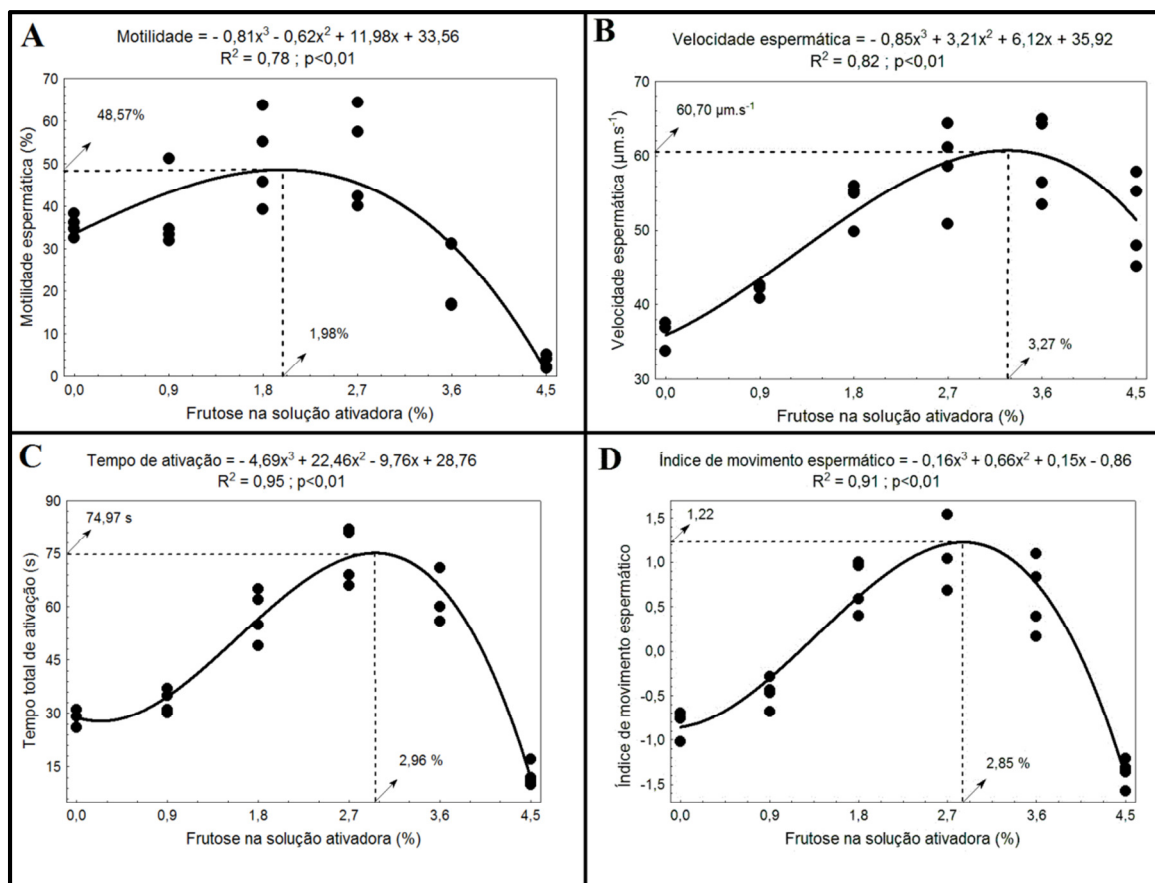


Fig. 1. Variáveis espermáticas do sêmen criopreservado do *Rhamdia quelen* submetido à diluição após o descongelamento em soluções contendo diferentes níveis de frutose. Avaliação realizada em 10 segundos após a ativação espermática. (A) Taxa de motilidade espermática (%); (B) Velocidade espermática ($\mu\text{m.s}^{-1}$); (C) Tempo de duração da ativação espermática (s); (D) Índice de movimento espermático.

3.2. Fertilização artificial dos ovócitos com soluções contendo frutose

O uso de sêmen criopreservado na reprodução artificial do *R. quelen* apresentou um efeito interativo ($p < 0,05$) entre a relação espermatozoides:ovócito e as concentrações de frutose das soluções ativadoras, sobre as taxas de fertilização (Fig. 2A; Fig 2B). O resultado obtido através do modelo de superfície de resposta sugere linhas com igual nível de fertilização (linhas de isofertilização). Estas linhas interceptam a reta de máxima taxa de fertilização teórica onde a concentração de frutose na solução ativadora sugere as menores relações espermatozoides:ovócito necessárias para garantir a manutenção das taxas de fertilização (Fig. 2B).

Os resultados sugerem que o procedimento normalmente utilizado em práticas de fertilização artificial de ovócitos do *R. quelen*, empregando-se 90.000 espermatozoides móveis:ovócitos e a adição de água destilada (ou sem a frutose) garantem 60,10% de sucesso na fertilização artificial (Fig. 2B). Os resultados também sugerem que as taxas de fertilização reduzem quando a disponibilidade de espermatozoide móveis:ovócito diminui e a solução ativadora não possui frutose (Fig. 2B). Por outro lado, quando a frutose é incorporada em 1,45% na solução ativadora e

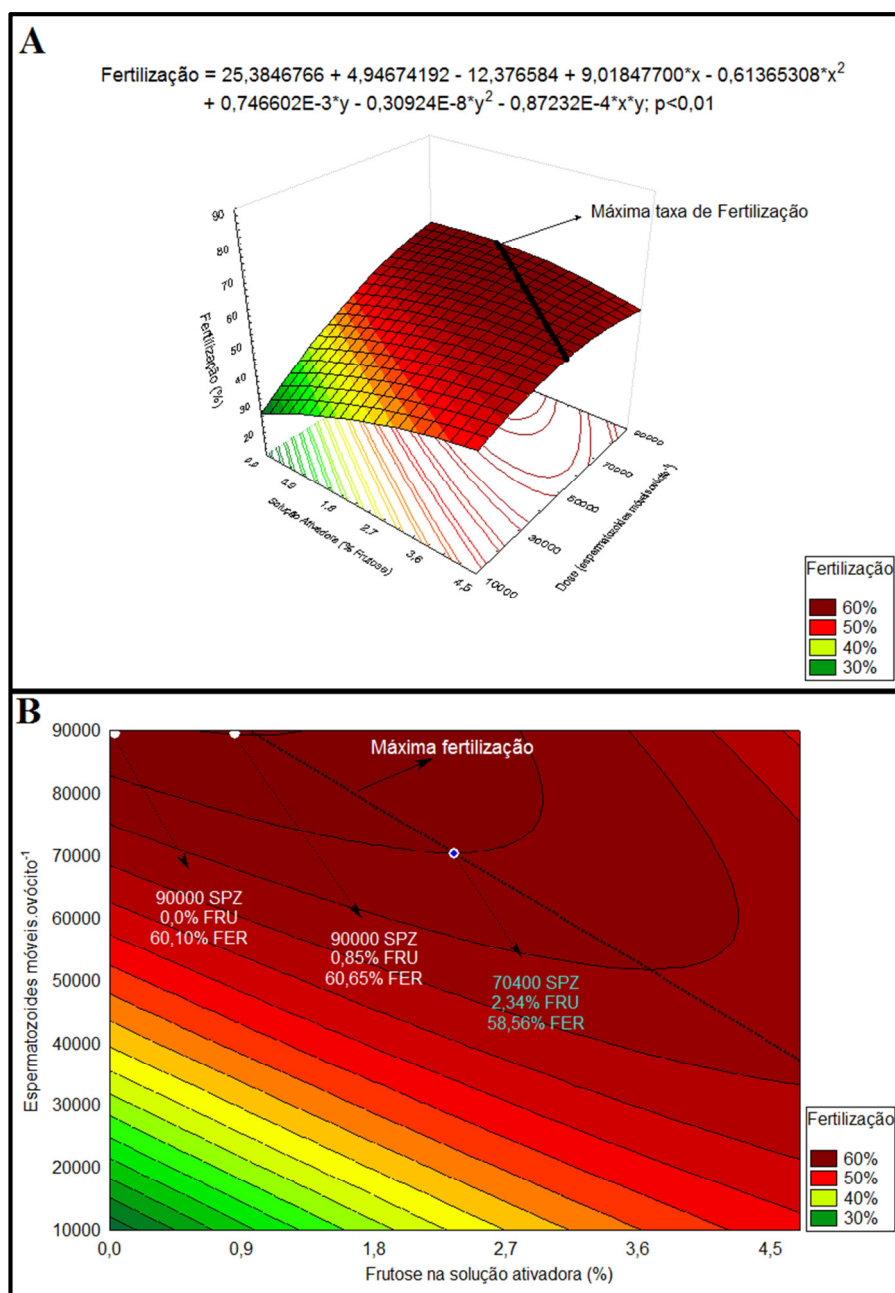
mantem-se a proporção de 90.000 espermatozoides móveis: ovócito, as taxas de fertilização podem ser melhoradas para 60,65% (Fig.2B).

Além disso, os resultados sugerem que o efeito modulador do movimento espermático que a frutose exerce sobre os espermatozoides proporciona a possibilidade de redução do número de espermatozoides móveis para fertilizar cada ovócito, sem promover intensos prejuízos sobre as taxas de fertilização (Fig. 2B). Segundo o modelo de predição, em procedimentos de fertilização artificial, o emprego de 70.400 espermatozoides móveis:ovócito e uma solução contendo 2,34% de frutose proporciona 58,56% de sucesso na fertilização dos ovócitos (Fig. 2B).

As taxas de eclosão se comportaram de maneira semelhante às taxas de fertilização, apresentando interação ($p<0,05$) entre a relação espermatozoide móveis:ovócito e as concentrações de frutose presentes nas soluções ativadoras (Fig. 3A; Fig. 3B).

O “índice de sucesso reprodutivo” obtido pelo agrupamento dos dados, também apresentou um comportamento semelhante ao das taxas fertilização e eclosão (Fig. 4A; Fig. 4B). Este modelo sugere que os maiores índices de sucesso reprodutivo, compostos pelas taxas de fertilização dos ovócitos e pelas taxas de eclosão dos ovos, foram obtidos com o emprego de 90.000 espermatozoides:ovócito e 1,45% de frutose na solução ativadora (Fig. 4B). De forma semelhante às outras variáveis, o modelo de predição também sugere a possibilidade de reduzir o número de espermatozoides móveis para fertilizar cada ovócito, sem promover grandes perdas sobre o sucesso reprodutivo. (Fig. 4B).

Finalmente, as taxas normalidade larval não foram influenciada pelos tratamentos ($p>0,05$), contudo, apresentaram efeito do bloco ($p<0,05$), ou seja, do grupo de fêmeas utilizado para constituir o “pool” de ovócitos nas diferentes repetições (Tabela 2). As diferentes proporções entre os volumes de sêmen e os volumes das soluções ativadoras empregados durante os procedimentos de fertilização artificial também não interferiram ($p>0,05$) sobre os resultados.



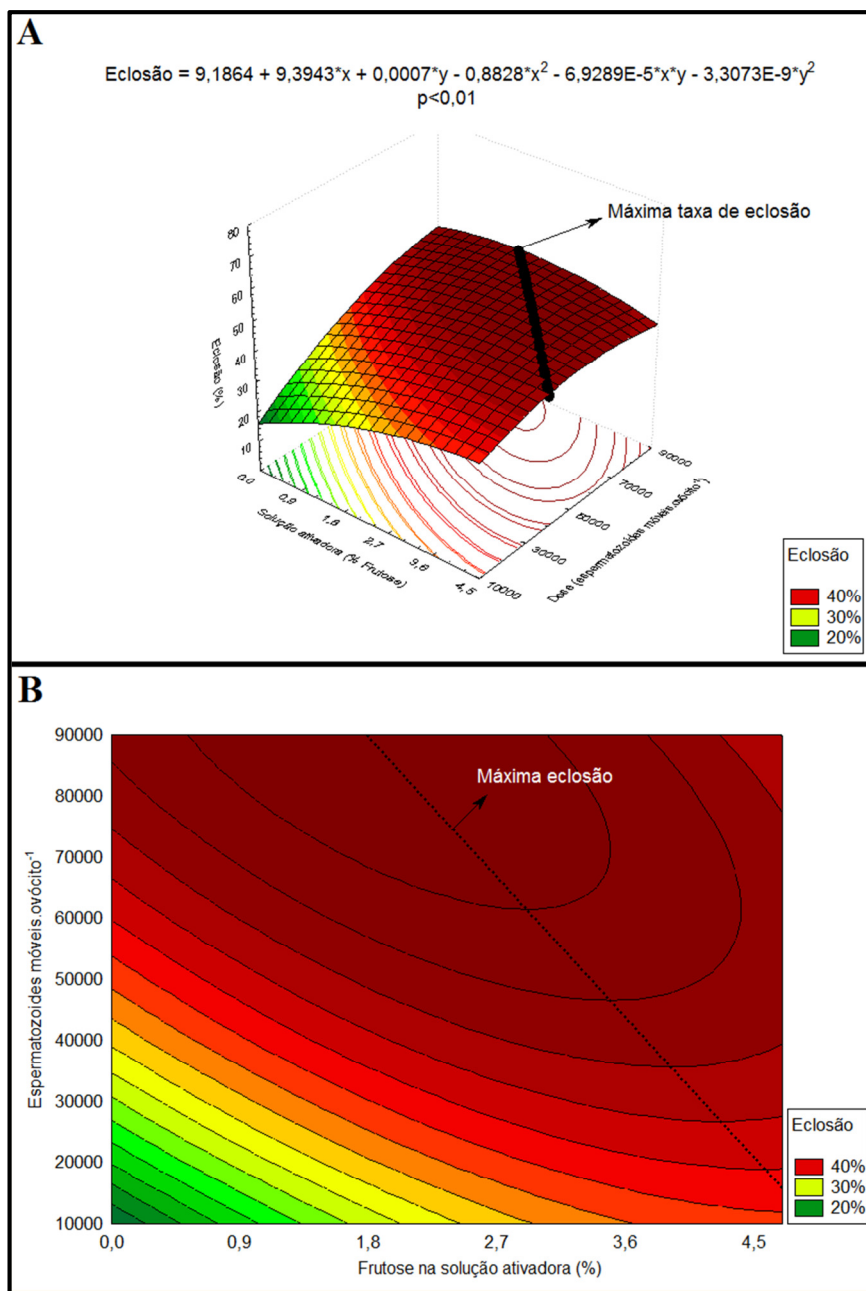


Fig. 3. Taxas de eclosão de embriões de *Rhamdia quelen* provenientes de ovócitos submetidos à fertilização artificial com sêmen criopreservado, em diferentes proporções de espermatozoides móveis:ovócito e empregando-se soluções ativadoras contendo diferentes níveis de frutose. Representação gráfica em três (A) e duas (B) dimensões.

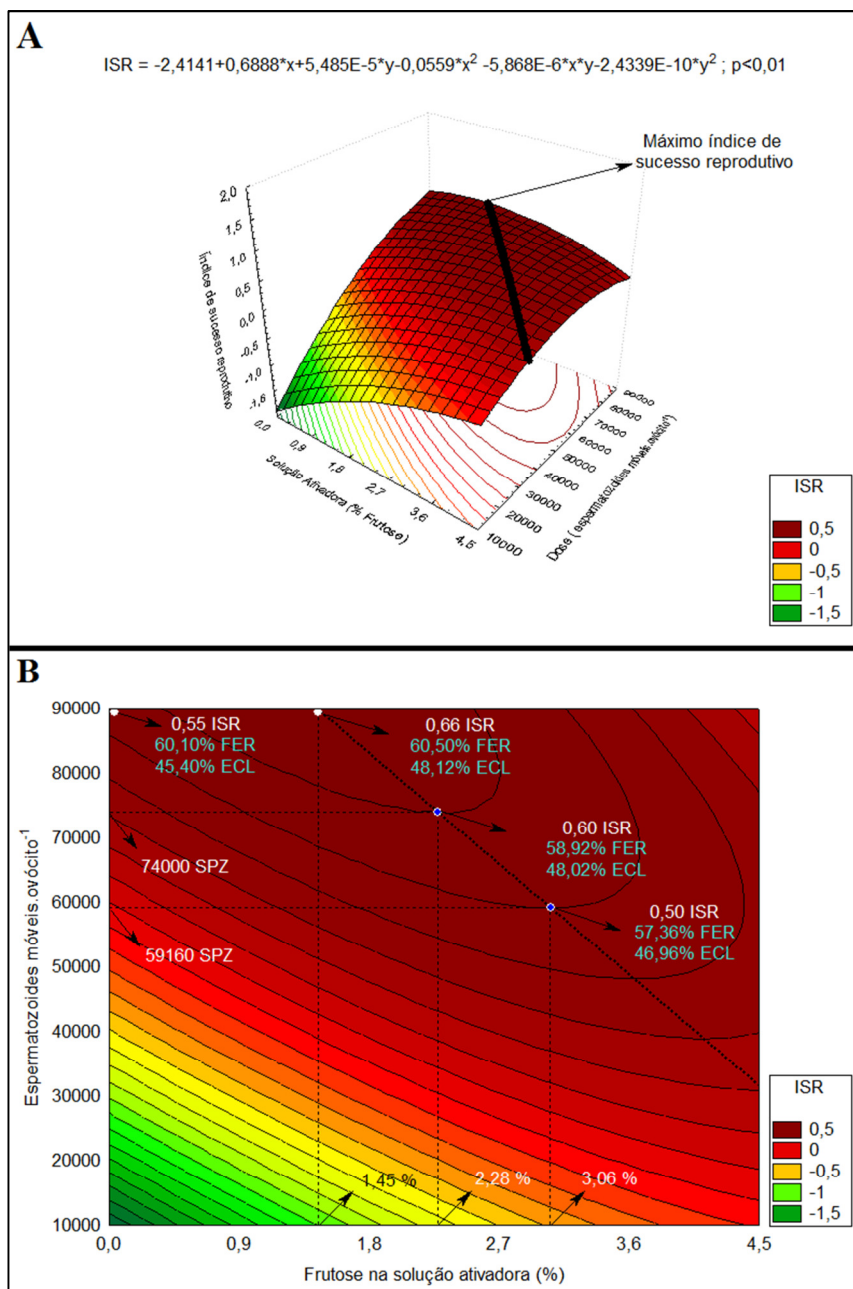


Fig. 4. Índice de sucesso reprodutivo em procedimento de reprodução artificial de *Rhamdia quelen* com uso de sêmen criopreservado, empregando-se diferentes proporções de espermatozoides móveis:ovócito e soluções ativadoras contendo diferentes níveis de frutose. Índice gerado pelo agrupamento dos dados de taxas de fertilização dos ovócitos e taxas de eclosão dos ovos. Representação gráfica em três (A) e duas (B) dimensões. ISR= índice de sucesso reprodutivo, FER= fertilização, ECL= eclosão, SPZ= espermatozoides.

Tabela 2

Percentual de larvas normais provenientes de embriões de *Rhamdia quelen* produzidos a partir de ovócitos submetidos à fertilização artificial com sêmen criopreservado, empregando-se diferentes proporções de espermatozoides móveis:ovócito e soluções ativadoras contendo diferentes níveis de frutose..

		Percentual de larvas normais (%)					
Solução Ativadora (% de frutose)		Espermatozoides móveis:ovócito					
		10000	30000	500000	70000	90000	<i>p</i>
0		94,89 ± 3,56	94,89 ± 2,50	94,89 ± 3,50	95,00 ± 2,65	95,00 ± 3,51	0,4017
0,9		94,22 ± 2,83	94,00 ± 3,28	93,67 ± 3,18	94,44 ± 2,36	94,33 ± 2,33	0,4017
1,8		94,89 ± 2,80	94,89 ± 2,01	94,89 ± 2,83	95,33 ± 2,03	94,78 ± 1,84	0,4017
2,7		94,78 ± 1,84	94,89 ± 2,59	95,00 ± 2,19	94,89 ± 2,87	94,67 ± 1,20	0,4017
3,6		94,67 ± 2,60	94,56 ± 2,34	93,89 ± 2,27	94,56 ± 3,72	94,11 ± 2,55	0,4017
4,5		94,78 ± 3,01	93,56 ± 2,50	94,56 ± 2,91	94,11 ± 2,41	94,22 ± 3,08	0,4017
Espermatozoides móveis:ovócito		10000	30000	500000	70000	90000	
Percentual de larvas normais (%)		94,70 ± 2,38	94,46 ± 2,22	94,48 ± 2,46	94,72 ± 2,33	94,52 ± 2,15	0,5379
Solução Ativadora (% de frutose)		0	0,9	1,8	2,7	3,6	4,5
Percentual de larvas normais (%)		94,93 ± 2,68	94,13 ± 2,41	94,96 ± 1,98	94,84 ± 1,87	94,36 ± 3,34	94,24 ± 2,40
Bloco		I	II	III			
Percentual de larvas normais (%)		91,78 ± 0,85 ^a	95,09 ± 0,76 ^b	96,87 ± 0,87 ^c	0,0001		

Dados representados por média ± desvio padrão; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

4. Discussão

As alterações nas variáveis de motilidade espermática em função das diferentes concentrações de frutose nas soluções ativadoras podem estar relacionadas com o diferencial de concentração osmótica existente entre o meio em que os espermatozoides estão criopreservados e o meio em que foram expostos para promover a ativação.

Esse diferencial de concentração tem sido sugerido como um dos principais fatores desencadeadores dos mecanismos de ativação/inativação espermática em peixes teleósteos [30]. De modo geral nos testículos e no plasma seminal os espermatozoides de muitas espécies de peixes encontram-se imóveis em função da isotonicidade entre as células espermáticas e o plasma seminal [31,32]. Porém, quando os espermatozoides são expostos a meios hipotônicos (peixes de água doce) ou hipertônicos (peixes marinhos), a diferença de osmolaridade, em conjunto com o pH e a concentração de íons, causam a despolarização das membranas celulares e ao estímulo de uma série de reações em cascata que levam a produção de ATP e, ao início do movimento flagelar dos espermatozoides [31]. Esse processo ocorre de forma adequada em faixas de diferencial osmótico espécie-específico, onde são proporcionados níveis ótimos de metabolismo celular e consequentemente de movimento espermático [33].

Os resultados do presente estudo evidenciaram que a melhor ativação espermática ocorre em soluções hipotônicas em relação ao sêmen fresco (252mOsm.Kg^{-1}) ou criopreservado (3.016mOsm.Kg^{-1}) do *R. quelen*. Contudo, o máximo percentual de células móveis ocorreu quando as soluções ativadoras apresentavam concentrações osmóticas abaixo de 100mOsm.kg^{-1} , enquanto que as máximas velocidades espermáticas por volta de 150 a 200mOsm.kg^{-1} . Esses resultados sugerem que outros fatores interferem no mecanismo de ativação espermática, conservando a integridade das células ou fornecendo combustível metabólico para modular o seu movimento.

O simples emprego de soluções hipotônicas não garantiu o máximo sucesso durante o processo de ativação espermática. As soluções ativadoras com concentrações osmóticas muito reduzidas promovem danos aos espermatozoides que refletem sobre o seu movimento, pois o choque osmótico induz ao inchaço das células devido ao influxo de água [34]. Além disso, alterações morfológicas na calda prejudicam a motilidade espermática [35] e o rompimento da estrutura pode ocasionar disfunção na membrana celular [36]. Por outro lado, soluções que proporcionam meios com níveis hipertônicos também não são eficientes na ativação espermática, pois inativam as células [32,37] e por este motivo, normalmente são empregadas como diluentes em procedimentos de estocagem de sêmen resfriado ou criopreservado.

Além da osmolaridade, o pH também é citado como um parâmetro envolvido na ativação e na manutenção da motilidade espermática em determinadas espécies [38]. Contudo, nesta pesquisa o

pH provavelmente não exerceu influência sobre o movimento espermático, pois não apresentou variação significativa entre as soluções.

Em geral, na maioria das espécies de peixes de água doce a duração do movimento espermático após a sua ativação é muito reduzida, permanecendo a célula móvel por poucos segundos ou minutos [39,40]. Esse curto período de tempo se deve ao fato da energia utilizada no processo ser proveniente do reduzido estoque de ATP intracelular acumulado nas mitocôndrias durante a capacitação espermática [41]. Apesar das soluções experimentais entre 150 e 200mOsm.kg⁻¹ induzirem a inativação parcial dos espermatozoides do *R. quelen*, a frutose presente possivelmente serviu como fonte de precursores metabólicos para o metabolismo energético das células, refletindo sobre as maiores velocidades e tempo de duração da ativação espermática. Essa hipótese pode ser sustentada quando se faz a analogia aos espermatozoides de mamíferos, onde a frutose extracelular pode ser utilizada via fosforilação oxidativa [42] para fornecer energia para o movimento espermático.

Apesar de os peixes que apresentam fertilização externa possuírem um limitado metabolismo oxidativo que dificulta o metabolismo de substratos extracelulares para a produção de energia [30], estudos reportam que ao menos em alguns teleósteos os espermatozoides possuem a capacidade de metabolizar nutrientes exógenos como piruvato, acetato, lactato, glioxilato e em menor grau a glicose [30,41]. Além disso, durante o movimento espermático os níveis de ATP podem ser mantidos em parte pela fosforilação de monossacarídeos [30], como relatado para o escalo (*Leuciscus cephalus*) [43] e a dourada (*Sparus aurata*) [44].

O aspecto mais relevante, e que deve ser discutido sobre as melhorias que a frutose presente nas soluções ativadoras promove sobre as variáveis de motilidade espermática do *R. quelen*, está relacionado ao potencial para otimização do uso dos espermatozoides em procedimentos de fertilização artificial. Como verificado neste experimento, na concentração correta a frutose melhora as taxas de motilidade, a velocidade e o tempo de duração da ativação espermática do sêmen criopreservado após o descongelamento. Tendo em vista que os ovócitos são ativados e adquirem capacidade de fertilização por um curto período de tempo após o contato com a água [45] e, que a motilidade e a velocidade espermática são as principais variáveis relacionadas ao sucesso na fertilização [14], as melhoras no movimento espermático certamente facilitam o encontro do sítio de fertilização (a micrópila) pelos gametas, refletindo positivamente sobre o sucesso reprodutivo [46].

Em rotinas de reprodução artificial do *R. quelen*, normalmente são utilizados aproximadamente 90.000 espermatozoides:ovócito para garantir as máximas taxas de fertilização [30]. Logo, os resultados desta pesquisa sugerem que o emprego de soluções contendo 2,34% de frutose em procedimentos de fertilização artificial de ovócitos de *R. quelen*, com sêmen criopreservado, possa modular o movimento espermático e promover a economia de espermatozoides. Os resultados mostram a possibilidade de economia 21,77% de espermatozoides

móveis nestes procedimentos devido a possibilidade de redução de 90.000 para 70.400 espermatozoides necessários para fertilizar cada ovócito, sem perdas consideráveis sobre as taxas de fertilização. De maneira semelhante, quando realizado o ajuste do modelo estatístico para o índice de sucesso reprodutivo, é verificada uma economia de 17,77% de células espermáticas móveis na dose inseminante, com perdas menores que 1,20% nas taxas de fertilização e sem prejuízos às taxas de eclosão.

Apesar das perdas, estes percentuais não representam grandes prejuízos produtivos, visto a elevada fecundidade de muitas espécies de peixes neotropicais, que no *R. quelen* é próxima a 230.000 ovócitos.kg de fêmea⁻¹[47], em comparação aos animais terrestres de criação. Neste caso, a possibilidade de economia de espermatozoides móveis é vantajosa, pois proporciona a redução do volume de sêmen a ser criopreservado em uma única dose e pode contribuir para a viabilidade do emprego dos bancos de sêmen para uso em larga escala. Além disso, a economia de espermatozoides vai promover a multiplicação do potencial reprodutivo de reprodutores de alto desempenho ou de importância genética. Consequentemente, isso possibilitará vantagens aos bancos de sêmen voltados à conservação de espécies e também maior lucratividade para empresas voltadas ao melhoramento genético na aquicultura.

Além disso, o uso dos modelos de predição gerados por esta pesquisa pode auxiliar na tomada de decisões relacionadas à criação ou ao gerenciamento de bancos de sêmen, independentemente da sua finalidade. Ou seja, mesmo que o uso de 2,34% de frutose na solução ativadora possibilite economia de espermatozoides, é possível predizer outros níveis de manipulação e considerar os riscos. Por exemplo, o uso de soluções contendo 3,06% de frutose pode promover uma economia ainda maior, correspondente a 34,26% sem afetar as taxas de eclosão, porém com perdas de 2,74% nas taxas de fertilização.

De modo geral, a dificuldade de descongelar grandes volumes de sêmen com qualidade para fertilizar a grande quantidade de ovócitos liberados por uma única fêmea é um dos motivos que inviabiliza o uso do sêmen criopreservado em bancos genéticos de peixes neotropicais para fins não experimentais ou comerciais [4,5]. Neste sentido, o uso de soluções moduladoras da ativação espermática, que promovam melhores rendimentos e economia de espermatozoides móveis contribuirão para a viabilização destes bancos genéticos, seja pela viabilidade das técnicas ou pela multiplicação do potencial reprodutivo de reprodutores de alto padrão genético. O conjunto destes fatores permitirá a consolidação do uso do sêmen criopreservado em larga escala para fins comerciais [2] ou conservacionistas, pois implicarão na redução dos custos de produção das doses inseminantes, na otimização de recursos biológicos e financeiros e na lucratividade do setor.

Mesmo que os resultados desta pesquisa sugiram a capacidade espécie-específica dos espermatozoides de *R. quelen* em absorver nutrientes do meio extracelular para uso no seu metabolismo energético, pesquisas voltadas para a elucidação dos mecanismos celulares

envolvidos no processo de ativação/inativação espermática e no metabolismo energético destas células deverão ser desenvolvidas.

5. Conclusão

Conclui-se que o emprego de frutose em soluções ativadoras para o sêmen criopreservado de *Rhamdia quelen* em concentrações adequadas promove melhorias sobre os parâmetros de movimento espermático. Estas melhorias permitem reduzir o número de espermatozoides móveis necessários para fertilizar cada ovócito, sem causar grandes prejuízos ao sucesso reprodutivo em termos de taxas de fertilização dos ovócitos, eclosão dos ovos e normalidade larval.

Referências

- [1] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 2009;35:137–50.
- [2] Tiersh TR. Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization. In: *Cryopreservation in aquatic species*, 2nd Edition. Tiersch TR, Green CC, Ed. World Aquaculture Society 2011:646–71.
- [3] Maria AN, Carneiro PCF. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. *Cienc anim* 2012;22(1):124–31.
- [4] Cabrita E, Robles V, Alvarez R, Herráez MP. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 2001;201:301–14.
- [5] Butts IAE, Feindel N, Neil S, Kovács E, Urbányi B, Trippel EA. Cryopreservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm in large-volume straws: applications for commercial production and gene banking. *Aquac res* 2011;42:1714–722.
- [6] Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* 2010;26:623–35.
- [7] Li J, Liu Q, Zhang S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *CJOL* 2006;24(4):370–77.
- [8] Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Soderquist L, Mapletoft R, Rodriguez-Martinez H. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination, *Int J Androl* 1999;22:366–73.
- [9] De Baulny BO, Le Vern Y, Kerboueuf D, Maisse G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 1997;34:141–49.

- [10] Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 2006;260:298–06.
- [11] Robles V, Cabrita E, Cuñado S, Herraéz MP. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 2003;224:203–12.
- [12] Valdebenito NI. Efecto de la Cafeína en la Motilidad y Fertilidad Espermática de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Inf tecnol* 2007;18(2):61–65
- [13] Neumann G. Frutose como ativador e crioprotetor espermático do Surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*). Monografia – Curso de Engenharia de Pesca – Universidade Estadual do Oeste do Paraná 2012. 38p.
- [14] Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 2004;234:1–28.
- [15] Sanches EA, Baggio DM, Piana PA, Souza BS, Bombardelli RA. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *R Bras Zootec* 2011;40(1):1–6.
- [16] Zarski D, Horváth A, Kotrik L, Targonska K, Palinska K, Krejszeff S, Bokor Z, Urbányi B, Kucharczyk D. Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs. *J Appl Ichthyol* 2012;28:967–72.
- [17] Felizardo VO, Murgas LDS, Drumond MM, Silva JA. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Rev. Ceres* 2010;57(5):648–52.
- [18] Bombardelli RA, Mörschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA, Syperreck MA. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *R Bras Zootec* 2006;35(4):1251–257.
- [19] Koakoski G, Oliveira TA, Rosa JGS, Fagundes M, Kreutz LC, Barcellos LJG. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of diferente ages. *Physiology & Behavior* 2012;106:129–32.
- [20] Woynarovich E, Horvath L. The Artificial Propagation of Warm-Water Finfishes – A Manual for Extension. Traduzido para o português por Chama VLM. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq; 1983. p. 39–83.
- [21] Baldisseroto B, Radünz-Neto J. Criação de jundiá. Santa Maria: Editora UFSM; 2004. p. 95–105.
- [22] Tessaro L, Toledo CPR, Neumann G, Krause RA, Meurer F, Natali MRM, Bombardelli RA. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture* 2012;326:74–80.

- [23] Bombardelli RA, Hayashi C, Natali MRM, Sanches EA, Piana PA. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivos e zootécnicos e a posição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. R Bras Zootec 2010;30(5):941–49.
- [24] Sanches EA, Bombardelli RA, Marcos RM, Neumann G, Toledo CPR, Romagosa E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. Aquac res 2010;42:153–56.
- [25] Wirtz S, Steinmann P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. J Fish Biol 2006;68:1896–902.
- [26] Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J Fish Biol 2003;63:472–89.
- [27] Pereira CR, Barcellos LJG, Kreutz LC, Quevedo RM, Ritter F, Silva LB. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. Braz J Biol 2006;66:1057–063.
- [28] Jezierska B, Lugowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiol Biochem 2009;35:625–40.
- [29] Quinn GP, Keough MJ. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. New York: Cambridge University Press; 2002. p. 111–154.
- [30] Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol 2010;165(3):535–48.
- [31] Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell biol int 2006;30:1–14.
- [32] Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. J Exp Zool 1983;107:95–03.
- [33] Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International 2004;12:69–85.
- [34] Hu J, Zhang Y, Zhou R, Zhang Y. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchoni*. Theriogenology 2009;72:704–10.
- [35] Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). Theriogenology 2009;72:32–43.
- [36] Bondarenko O, Dzyuba B, Cosson J, Yamaner G, Prokopchuk G, Psenicka M, Linhart O. Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: Interspecies differences. Theriogenology 2013;79:872–81.

- [37] Martínez JG, Atencio VG, Pardo SC. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). Rev MVZ Córdoba 2011;16(2):2554–563.
- [38] Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review Cell biol int 2005;29:101–10.
- [39] Billard R, Marcel J, Matei D. Survive post mortem des gametes de truite fario, *Salmo trutta fario*. Can J of Zoo 1980;59:29–33.
- [40] Burness G, Moyes CD, Montgomerie R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*). Comp biochem physiol Part A 2005;140(1):11–17.
- [41] Ingermman RL, Schultz CLF, Kanuga MK, Wilson-Leedy JG. Metabolism of motile zebrafish sperm. Comparative Biochemistry and Physiology 2011;158:461–67.
- [42] Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology 2001;56:801–15.
- [43] Lahnsteiner F, Patznerl RA, Weismann T. Monosaccharides as energy resources during motility of spermatozoa in *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae, Teleostei). Fish Physiol and Biochem 1992;10(4):283–89.
- [44] Lahnsteiner F, Caberlotto S. Motility of gilthead seabream *Sparus aurata* spermatozoa and its relation to temperature, energy metabolism and oxidative stress. Aquaculture 2012;307-371:76–83.
- [45] Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Rev Fish Biol Fish 2002;12:33–58.
- [46] Gallego V, Pérez AL, Asturiano JF, Yoshida M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). Aquaculture 2013;416-417:238–43.
- [47] Gomiero LM, Souza UP, Braga FMS. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. Biota Neotropica 2007;7(3):127–33.