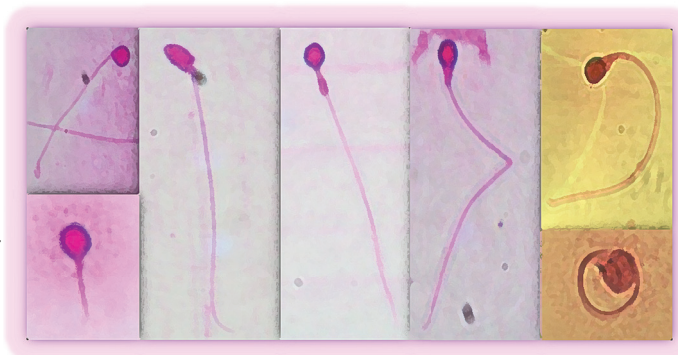


Ilustração: Alexandre Nizio Maria



Protocolo para Avaliação Morfológica de Espermatozoides de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Alexandre Nizio Maria¹
Hymerson Costa Azevedo²
Rodrigo Yudi Fujimoto³
Paulo César Falanghe Carneiro⁴
Jéssica Queiroz Pardo⁵

O tambaqui *Colossoma macropomum* é originário da Bacia Amazônica e criado em muitos países da América do Sul, sendo a espécie de peixe nativa mais produzida no Brasil por apresentar boa adaptabilidade às condições de cativeiro, excelente desempenho produtivo, alto valor de mercado e carne saborosa já conhecida por grande parte da população.

Atualmente quase a totalidade da engorda do tambaqui é feita em viveiros escavados e em tanques-redes alocados em grandes reservatórios da União, sendo caracterizada por sistemas intensivos e semi-intensivos que demandam formas jovens como insumo primário de produção. No Brasil há várias pisciculturas especializadas na produção de alevinos e juvenis de tambaquis que contam com laboratório de reprodução e mantêm plantéis de reprodutores para atender a demanda das pisciculturas de engorda. Porém, nos últimos anos vem aumentando a demanda por alevinos e juvenis de alto desempenho, fazendo com que os laboratórios de reprodução busquem melhorias em seus plantéis de reprodutores e em seus métodos de produção.

Neste contexto, a escolha de reprodutores férteis, atestada por meio de avaliação andrológica, deve ser considerada como importante etapa do

manejo reprodutivo nas pisciculturas voltadas à produção de alevinos e juvenis. A seleção de machos com boa qualidade de sêmen pode garantir bom desempenho reprodutivo e produtivo do plantel. Adicionalmente, os benefícios da aplicação desse manejo podem ir além e auxiliar na conservação e disseminação de material genético dos plantéis de tambaquis.

A análise morfológica dos espermatozoides tem sido bastante utilizada na seleção de machos doadores de sêmen para o manejo reprodutivo ou para o uso em biotecnologias da reprodução de vários animais, sendo recentemente utilizada para algumas espécies de peixes de interesse econômico e ambiental. A análise morfológica tem como objetivo avaliar a integridade das estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda, tendo em vista a capacidade fertilizante dos espermatozoides e consequentemente a fertilidade do sêmen. Qualquer alteração em uma dessas estruturas pode afetar a funcionalidade do espermatozoide por alterar a sua capacidade de deslocamento, fecundação e de geração de alevinos viáveis.

Na preparação da amostra de sêmen para a avaliação morfológica dos espermatozoides geralmente há necessidade do uso de

¹Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

³Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁴Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵Graduanda em Medicina Veterinária, estagiária da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

soluções fixadoras para manter inalteradas suas características espermáticas. No preparo dos esfregaços são utilizados corantes específicos que auxiliam a visualização das estruturas espermáticas que são translúcidas (STREIT JÚNIOR et al., 2004; ARRUDA et al., 2011) e de dimensão reduzida, como no caso do tambaqui.

Alterações morfológicas dos espermatozoides são oriundas de efeitos ambientais, sanitários, fisiológicos e genéticos. Contudo, algumas destas alterações, classificadas como primárias por ocorrerem durante o processo de espermatogênese, podem ser decorrentes de fatores externos sobre os reprodutores como má nutrição, ocorrência de enfermidades e estresse. Já as alterações secundárias têm sua origem na manipulação do sêmen no momento da coleta, caso haja excessiva pressão sobre os testículos (MARIA et al., 2011), ou no preparo das lâminas, quando da realização do esfregaço ou da câmara úmida. Além da classificação em efeitos primários e secundários, alguns autores (BLOM, 1973; COLÉGIO..., 2013) sugerem ainda que as alterações morfológicas sejam separadas em maiores, quando causam prejuízo maior na fecundação, ou menores, quando não interferem diretamente no processo, levando-se em conta o potencial fertilizante do espermatozoide.

A análise morfológica dos espermatozoides pode, juntamente com outras avaliações, prever o desempenho reprodutivo dos machos e aumentar a efetividade da aplicação de biotecnologias como a criopreservação do sêmen. Entretanto, a maioria das metodologias e práticas utilizadas para avaliação andrológica no tambaqui é baseada em procedimentos desenvolvidos para mamíferos (BLOM, 1973; BARTH; OKO, 1989; SILVA et al., 2016) ou para outras espécies de peixes (COLÉGIO..., 2013), sendo, por isso de eficácia duvidosa.

O desenvolvimento e a padronização de um método de avaliação andrológica específico para o tambaqui poderá aumentar a eficiência na seleção de espécimes destinados à formação de plantéis de reprodutores, tanto para atender a forte demanda do mercado de alevinos e juvenis, como para fins de formação de bancos de sêmen destinados à conservação de recursos genéticos animais e disseminação de material genético para programas de melhoramento da espécie. Assim, neste documento apresentamos de forma detalhada um protocolo simples de avaliação da morfologia espermática do sêmen de tambaqui.

Procedimento de Avaliação Morfológica

As soluções utilizadas no procedimento são simples, podendo ser preparadas em laboratório próprio ou em laboratórios de manipulação.

Preparo das soluções de trabalho

- **Formol Citrato:** Fixador do sêmen para avaliação morfológica de espermatozoides.

Reagentes utilizados:

- 100 mL de água destilada;
- 4 mL de formol (37%);
- 2,9 g de Citrato de Sódio.

Método de preparo:

- 1) adicionar 50 mL de água destilada e 2,9 g de citrato de sódio em um recipiente e dissolver;
- 2) acrescentar 4 mL de formol (37%);
- 3) passar a solução do recipiente para uma proveta graduada e completar o volume com água destilada até 100 mL;
- 4) armazenar em frascos de vidro em geladeira a 4 °C.

- **Rosa Bengala:** Corante para análise de ocorrência de alterações morfológicas de espermatozoides.

Reagentes utilizados:

- 3 g de Rosa Bengala;
- 100 mL de água destilada.

Método de preparo:

- 1) dissolver o rosa bengala em 50 mL de água destilada em um recipiente;
- 2) transferir a solução do recipiente para uma proveta graduada e completar com água destilada até o volume de 100 mL;
- 3) filtrar a solução em filtro de papel;
- 4) armazenar em frascos de vidro âmbar em geladeira a 4 °C.

Fixação e coloração da amostra e confecção da lâmina

- 1) diluir alíquotas de sêmen em solução fixadora de formol citrato na proporção aproximada de 1:99 (sêmen:solução). A amostra pode ser conservada em solução fixadora dentro de microtubos hermeticamente fechados por 30 dias sem nenhuma alteração;

2) adicionar sobre a lâmina de trabalho, na extremidade esquerda, 15 μ L de sêmen fixado;

3) adicionar sobre a gota de sêmen fixado, 0,5 μ L de solução de rosa bengala (proporção de 1:30, corante:sêmen fixado);

4) posicionar uma lâmina extensora sobre a lâmina de trabalho contendo a amostra fixada e corada mantendo-a inclinada em um ângulo de 45° e numa posição posterior, à direita da amostra (Figura 1A);

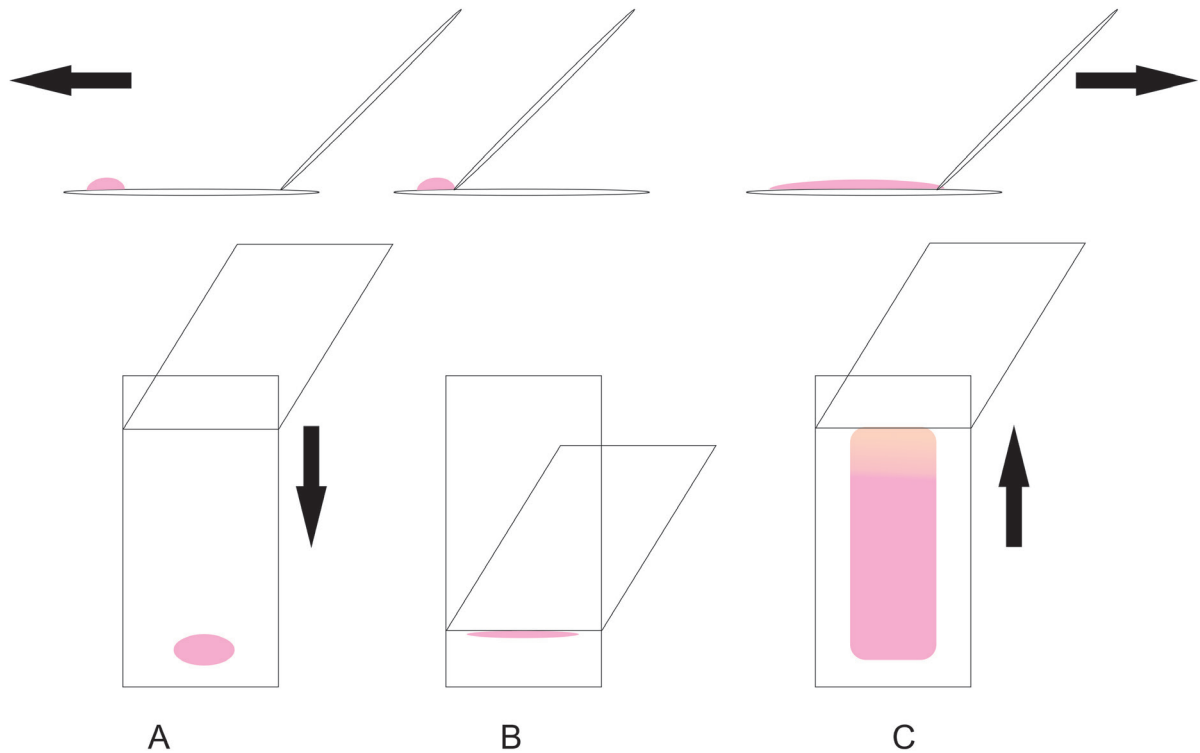


Figura 1. Confeção de um esfregaço de amostra de sêmen corada. Ilustração: Jéssica Queiroz Pardo

5) deslocar suavemente a lâmina extensora para a esquerda da lâmina de trabalho até que sua extremidade toque a amostra (Figuras 1A e 1B);

6) aguardar que a amostra se espalhe lateralmente por capilaridade (Figura 1B);

7) mantendo-se o mesmo ângulo de 45°, fazer um deslocamento suave e uniforme da lâmina extensora para a direita, espalhando por distensão toda a amostra pela lâmina de trabalho até que se forme uma área franjada da amostra na parte final do esfregaço chamada de cauda (Figura 1C);

8) secar imediatamente a lâmina em temperatura ambiente agitando-a no ar;

9) identificar a lâmina na extremidade esquerda com marcador permanente e/ou etiqueta.

Leitura e Interpretação das lâminas

Para entender as alterações na estrutura do espermatozoide é necessário conhecer informações básicas sobre a morfologia e morfometria de uma célula normal. Resumidamente, um espermatozoide

normal do tambaqui apresenta uma cabeça redonda, uma peça intermediária triangular e um flagelo longo (MARIA et al., 2010).

Para realização do procedimento de avaliação das lâminas devem-se seguir os seguintes passos:

1) realizar a leitura da lâmina em microscópio óptico com magnitude de 1000x sob imersão em óleo;

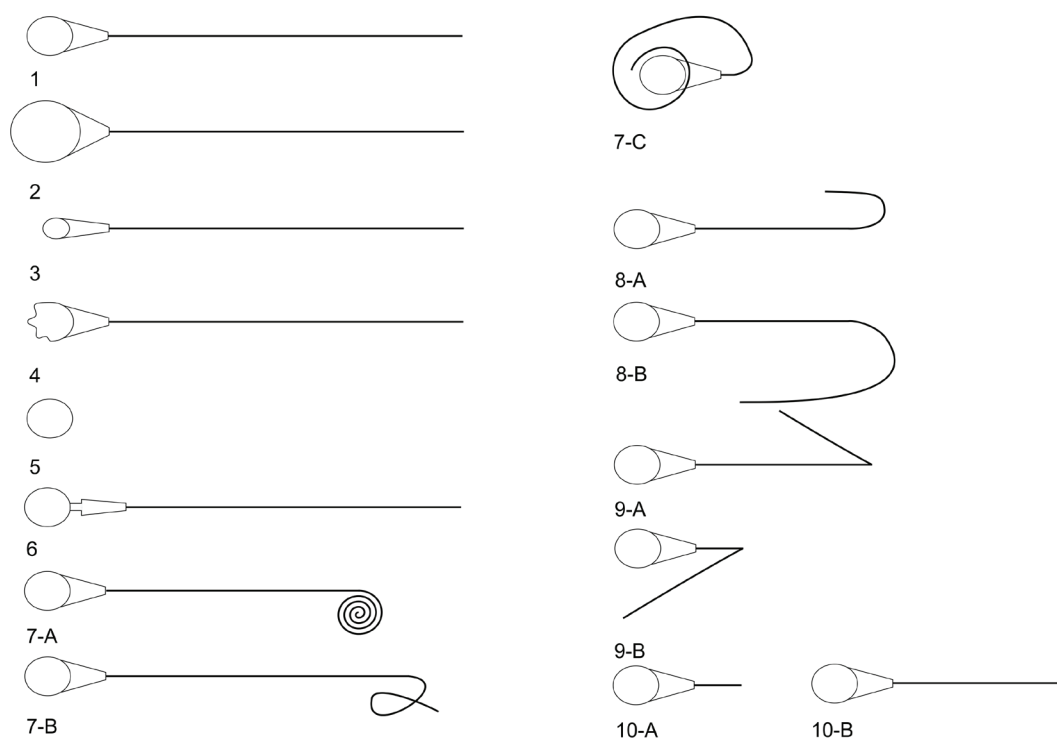
2) realizar a contagem de 100 células visualizando a lâmina da esquerda para a direita com movimentos em zigue-zague;

3) evitar ler os campos de visão localizados nas extremidades da lâmina onde a amostra costuma estar muito espessa, com maior possibilidade de sobreposições de células, ou muito fina, com poucas células espaçadas;

4) contar, com auxílio de um contador de células, o número de espermatozoides normais e com alterações morfológicas de cabeça, peça intermediária e cauda (Ver as características das alterações na Tabela 1 e na Figura 2);

Tabela 1. Alterações morfológicas dos espermatozoides de tambaqui.

Alteração morfológica	Característica
Macrocefalia (Ma)	Cabeça com tamanho aumentado.
Microcefalia (Mi)	Cabeça com tamanho reduzido.
Cabeça degenerada (CDe)	Cabeça de tamanho normal, mas que apresenta contorno irregular.
Cabeça isolada normal (CIN)	Cabeça sem cauda, porém de tamanho normal e sem qualquer contorno irregular.
Peça intermediária degenerada (PID)	Alterações na espessura e/ou comprimento da peça intermediária envolvendo seu formato ou sua inserção na cabeça.
Cauda enrolada (CE)	Dobradura e enovelamento do flagelo sobre si mesmo ou sobre a cabeça.
Cauda dobrada (CD)	Dobradura do flagelo, em diversos graus, sem envolver a si mesmo ou a cabeça.
Cauda fraturada (CF)	Fratura e retenção do flagelo
Cauda curta (CC)	Flagelo mais curto que o normal, descontinuado ou fraturado sem sua retenção.

**Figura 2.** Principais alterações morfológicas nos espermatozoides de tambaqui. **1.** Espermatozoide normal; Alterações na cabeça: **2.** Macrocefalia. **3.** Microcefalia. **4.** Degenerada. **5.** Isolada normal. **6.** Peça intermediária degenerada; Alterações na cauda: **7.A-C.** Cauda enrolada. **8.A-B** Cauda dobrada. **9.A-B** Cauda Fraturada. **10.A-B** Cauda curta. Ilustração: Jéssica Queiroz Pardo

5) contar apenas um defeito por célula anormal. Se forem observados dois ou mais defeitos na mesma célula deve-se registrar apenas o de maior frequência;

6) Calcular o percentual de células anormais.

Os espermatozoides também podem apresentar alterações morfológicas mais raras de serem

observadas como duas cabeças, duas caudas e gota citoplasmática que também devem ser registradas e contabilizadas quando encontradas na amostra.

Na figura 2 é possível verificar ilustrações de espermatozoides que auxiliarão tanto na avaliação do sêmen fresco e congelado pelo técnico de campo como na pesquisa laboratorial. As

imagens estão divididas em espermatozoides normais, alterações de cabeça espermática, alteração de peça intermediária, alterações de cauda espermática.

Considerações Finais

Os procedimentos para análise morfológica de espermatozoides de tambaqui descritos nesta publicação podem ser facilmente replicados e inseridos na rotina de seleção e manejo dos reprodutores. O percentual de alterações morfológicas recomendado em uma amostra seminal de tambaqui não deve ser maior que 35%. A disseminação dessas informações permitirá que técnicos que executam atividades de análise andrológica de tambaqui, ou mesmo de outras espécies de peixes, possam melhorar seus processos, bem como, aplicá-las na rotina de trabalho em campo. A melhoria desta prática poderá aumentar a eficiência reprodutiva dos plantéis, possibilitando a otimização da oferta de alevinos e contribuindo com trabalhos de conservação de recursos genéticos da espécie.

Referências

- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIME, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p.145-151, abr./jun. 2011.
- BARTH; A. D.; OKO R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermiogram. **Nordis Veterinaermedizin**, v. 25, p. 383-391, 1973.
- COLÉGIO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779–783, 2010.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, v. 20, p. 39-43, fev. 2011.
- STREIT JÚNIOR; D. P.; MORAES; G. V.; RIBEIRO; R. P.; POVH; J. A.; SOUZA; E. D.; OLIVEIRA; C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 157-162, jul./dez. 2004.
- SILVA, A. E. D. F.; MARTINS, C. F.; SILVA, C. G.; CUNHA, E.; CARVALHO, J. O.; DODE, M. A. N. **Atlas de morfologia espermática bovina**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. v. 1. 100 p.

Comunicado Técnico, 207

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,
CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1344
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac



1ª edição
On-line (2017)

Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes
Secretário-Executivo: Marcus Aurélio Soares Cruz
Membros: Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva Léo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim, Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas e Viviane Talamini

Expediente

Supervisora editorial: Flaviana Barbosa Sales
Normalização bibliográfica: Josete Cunha Melo
Editoração eletrônica: Beatriz Ferreira da Cruz