



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

ADEMIR PIRES RODRIGUES

**CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*
Curvier, 1818) CRIADOS EM PISCICULTURA.**

ARAGUAÍNA (TO)

2018

ADEMIR PIRES RODRIGUES

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TAMBQUI (*Colossoma macropomum* Curvier,
1818) CRIADOS EM PISCICULTURA.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal.

Orientador: Dr. Marcio Gianordoli T. Gomes

Coorientador: Dr. Sandro Estevan Moron

ARAGUAÍNA (TO)

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- R696c Rodrigues, Ademir Pires .
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* Curvier, 1818) CRIADOS EM PISCICULTURA. / Ademir Pires Rodrigues. – Araguaína, TO, 2018.
53 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2018.
Orientador: Marcio Gianordoli Teixeira Gomes
Coorientador: Sandro Estevan Moron
1. Eletroforese unidimensional. 2. Integridade de membrana. 3. Peixes. 4. Proteômica. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ADEMIR PIRES RODRIGUES

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* Curvier,
1818) CRIADOS EM PISCICULTURA.

Dissertação apresentada à UFT - Universidade Federal do Tocantins – Campus universitário de Araguaína, Curso de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, foi avaliado para a obtenção do título de mestre em Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Aprovado em: 08 / 03 / 2018.

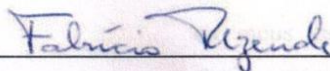
Banca examinadora:



Prof. Dr. Marcio Gianordoli T. Gomes. Orientador, UFT.



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron. Examinador, UFT.



Pesquisador Dr. Fabrício Pereira Rezende. Examinador, Embrapa.

Dedico esse trabalho a Deus, por ter me dado o dom da vida e por iluminar e guiar todos os meus caminhos. Aos meus pais Luiz Odete Alves Rodrigues e Nativa Pires Rodrigues e todos os meus irmãos, pois a eles devo tudo que sou.

RESUMO

O objetivo destes estudos foi de avaliar os parâmetros seminais e o perfil eletroforético do plasma seminal de machos de tambaqui, induzidos com extrato hipofisário de carpa (0,5 mg/kg) e correlacionar com possíveis marcadores de qualidade seminal. O aprimoramento das técnicas da reprodução já existentes para tambaqui, assim como o desenvolvimento de metodologias com estes estudos, serão capazes de aprimorar os programas de melhoramento genético e eficiência reprodutiva dos plantéis comerciais. Além disso, servirão para auxiliar programas de conservação e recuperação de espécies em risco de extinção. As coletas seminais ocorreram na Fazenda São Paulo, aquicultura localizada no município de Brejinho de Nazaré, Tocantins. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal da Universidade Federal do Tocantins (protocolo de número 23101.001692/2015-65). Dentre os parâmetros avaliados, o volume seminal médio foi de 3,31 mL/4,18 ± 0,46 kg de peso vivo e prevalência de aspecto leitoso (62,5%). A motilidade média foi de 78,75% e o vigor médio na escala 3,5. A concentração espermática média foi 12,68 x 10⁹ espermatozoides/mL, com defeitos menores foram em média 5,50% e defeitos maiores em 2,56% dos espermatozoides, sendo em média 84,50% de espermatozoides íntegros através do teste de eosina-nigrosina. O teste de viabilidade espermática ocorreu pela aplicação de nova metodologia, sem a necessidade de aquecer a solução corante e o sêmen a 37 °C e sem o pré-aquecimento das lâminas microscópicas. Com o perfil eletroforético do plasma seminal detectou-se um total de 26 bandas proteicas com pesos moleculares que variam de 9,87 a 221,93 kDa, com predominância de proteínas com baixos pesos moleculares. A presença de proteínas com baixo peso molecular é um indicativo de qualidade seminal e fertilidade, e serve como parâmetro de qualidade seminal para uso na criopreservação em bancos de gametas desta espécie.

Palavras-chave: eletroforese unidimensional, integridade de membrana, peixes, proteômica.

ABSTRACT

The aim of these studies was to evaluate the seminal parameters and the electrophoretic profile of the seminal plasma of males tambaqui, induced with pituitary carp extract (0.5 mg / kg) and correlate with possible seminal quality markers. The improvement of already existing biotechniques of reproduction for tambaqui, as well as the development of methodologies with these studies, will be able to improve the programs of genetic improvement and reproductive efficiency of the commercial plants. In addition, they will serve to assist programs of conservation and recovery of endangered species. Seminal collections took place at Fazenda São Paulo, aquaculture located in the county of Brejinho de Nazaré, Tocantins. This study was approved by the animal use ethics committee of the Federal University of Tocantins (protocol number 23101.001692 / 2015-65). Among the evaluated parameters, the mean seminal volume was 3.31 mL / 4.18 ± 0.46 kg of body weight and prevalence of milky appearance (62.5%). The mean motility was 78.75% and the mean vigor on the 3.5 scale. The mean spermatic concentration was 12.68 x 10⁹ spermatozoa / mL, with minor defects were on average 5.50% and major defects in 2.56% of spermatozoa, with an average of 84.50% spermatozoa being intact through the eosin-nigrosine test. The sperm viability test was carried out by the application of a new methodology, without the need to heat the dye solution and the semen at 37 ° C and without the preheating of the microscopic slides. With the electrophoretic profile of the seminal plasma, a total of 26 protein bands with molecular weights ranging from 9.87 to 221.93 kDa were detected, with a predominance of proteins with low molecular weights. The presence of low molecular weight proteins is an indication of seminal quality and fertility, and serves as a seminal quality parameter for use in cryopreservation in germplasm banks of this species.

Keywords: fish, membrane integrity, one-dimensional electrophoresis, proteomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo II

- Figura 1 - Esfregaço espermático de tambaqui (*C. macropomum*) corado com eosina-nigrosina: campo de leitura da lamina corada em microscópio de luz sob óleo de imersão. As setas demonstram as células mortas (inviáveis) coradas em rosa, enquanto as células vivas (viáveis) não são coradas..... 36

Capítulo III

- Figura 1 - Eletroforese unidimensional em gel poliacrilamida 12,5% (corado com Comassie Brilliant Blue R-250) de plasma seminal de tambaqui. À esquerda da figura está o marcador molecular (Amersham ECL Rainbow Marker - Full Range) como referência de pesos variando de 12 a 225 kDa. As colunas à direita com as numerações (1 a 8) consistem nas bandas proteicas do plasma seminal de cada reprodutor. As setas indicam as bandas com picos de maior intensidade..... 48

LISTA DE TABELAS

Capitulo II

- Tabela 1 - Viabilidade espermática mensurada pela avaliação em microscopia de luz e teste de eosina-nigrosina pelo método adaptado de preparo sem aquecimento em sêmen fresco de machos de tabaqui..... 37
- Tabela 2 - Motilidade e viabilidade espermática mensurada pela avaliação em microscopia de luz e teste de eosina-nigrosina, em sêmen fresco de machos de tabaqui..... 37

LISTA DE SIGLAS

1D	Unidimensional
EBH	Extrato Bruto de Hipófise de carpa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PB	Proteína Bruta
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
UFT	Universidade Federal do Tocantins

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
G	Força G
kDa	Kilodalton

SUMARIO

CAPITULO I.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Tabaqui: habitat, manejo e reprodução.....	14
2.2 Avaliações espermáticas.....	16
2.2.1 Motilidade espermática.....	17
2.2.2 Vigor.....	18
2.2.3 Volume.....	19
2.2.4 Aspecto.....	20
2.2.5 Concentração espermática.....	20
2.2.6 Viabilidade espermática.....	21
2.2.7 Morfologia espermática.....	21
2.2.8 Proteínas do plasma seminal.....	23
3 CONSIDERAÇÕES.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
CAPITULO II.....	32
Viabilidade espermática em sêmen de tabaqui pelo uso da coloração com eosina-nigrosina.....	33
ABSTRACT.....	33
REFERÊNCIAS.....	38
CAPITULO III.....	39
Caracterização do perfil eletroforético de plasma seminal de tabaqui (<i>Colossoma macropomum</i> , Curvier 1818).....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

Os peixes de água doce da região neotropical são responsáveis pela maior diversidade do mundo nesta categoria. Há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 9.000 espécies e estima-se que cerca de 40% desta ictiofauna continua desconhecida (REIS et al., 2016). A família Serrasalmidae é uma das mais encontradas, bem disseminada pela sua carne saborosa, branca e firme, e por apresentar praticidade de manejo e rápido retorno econômico quando criados em cativeiro (LOWE-MCCONNELL, 1999).

Em relatório recente da FAO (2016) foi demonstrado que países em desenvolvimento, a produção de peixes de escama em sistemas em tanques de terra representa uma prática comum que oferece benefícios relacionados à segurança alimentar e nutricional. Destaca-se que dos 25 países produtores de espécies de peixes de escamas, o Brasil alcança o 14º lugar com produção de 474,8 mil t registrada em 2014.

Na piscicultura brasileira, a produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*), segundo o IBGE (2016) foi de 135,9 mil t, demonstrando seu favoritismo pelo mercado e lucratividade. Devido à demanda de mercado e o avanço na produção, o tambaqui encontra-se na lista das espécies prioritárias para pesquisas de melhoramento genético (MARIA et al., 2011).

Atualmente nos sistemas de cultivo, o conteúdo espermático coletado de muitos reprodutores é frequentemente caracterizado como de baixa qualidade e quantidade, prejudicando os índices de fertilidade do plantel e conseqüentemente, trazendo prejuízos econômicos (RURANGWA et al., 2004). Diante disso, o uso de parâmetros seminais, como a motilidade, vigor, concentração, morfologia e viabilidade espermática (CBRA, 2013) são essenciais para avaliar a qualidade seminal desses exemplares, possibilitando resultados economicamente viáveis para a aquicultura nacional.

Aliado a as avaliações de rotina, avanços em estudos proteômicos do plasma seminal através da eletroforese unidimensional vêm crescendo no intuito de elucidar a função destas proteínas sobre a qualidade espermática e seu papel na fertilidade (CIERESZKO et al., 2017), podendo ser aplicadas em pesquisas de melhoramento genético e auxiliar nas avaliações espermáticas de rotina nas pisciculturas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tambaqui: Habitat, manejo e reprodução

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), peixe da família Serrasalmidæ e ordem Characiforme, é uma espécie migratória de água doce da ictiofauna nativa, que devido a sua rusticidade, fácil manejo e crescimento acelerado alcançou o recorde de maior produção na aquicultura nacional. Sendo crescente o seu cultivo nas regiões norte e nordeste do Brasil. Ó tambaqui é nativo da bacia amazônica, principalmente nos rios Solimões, Madeira e Orinoco, onde devido a sua importância ecológica e econômica figura entre as espécies de maior interesse para a pesquisa (QUEIROZ et al., 2002; KUBITZA, 2004; BRASIL, 2011).

Em seu habitat natural, o tambaqui pode atingir até 110 cm de comprimento e alcançar pesos superiores a 30 kg e expectativa de vida de até 14 anos (GOULDING & CARALHO, 1982), sendo reconhecido como o segundo maior peixe de escamas da ictiofauna brasileira de água doce, logo atrás do pirarucu (*Arapaima gigas*) (KUBITZA, 2004).

Seus dentes molariformes resistentes possibilitam ao tambaqui consumir diferentes alimentos de acordo com a estação do ano, variando sua dieta desde zooplâncton a frutos, folhas e galhos moles, sementes de árvores nativas que estão sobre o rio, invertebrados aquáticos ou que caem nas águas durante a estação das cheias (MORAIS & O'SULLIVAN, 2017).

Devido a sua rusticidade e boa adaptação em diferentes ambientes, o cultivo desta espécie na região norte e nordeste tem sido vantajosa e de grande sucesso devido as suas condições climáticas (IZEL et al., 2014).

Para o cultivo de tambaqui, Izel et al. (2014) recomendam que seja em tanques de profundidade mínima de 1,70 m, podendo ser do tipo escavado ou semiescavado. O tamanho e formato do tanque ficam a critério do produtor, ressaltando apenas a importância de que tanques muito pequenos estão mais sujeitos às interferências climáticas e físico-químicas da água.

Na região nordeste, com o intuito de oferecer uma alternativa aos piscicultores do semiárido, além dos métodos tradicionais mencionados anteriormente, o cultivo vem sendo realizado em canais de irrigação, com custo baixo e mantendo os padrões de qualidade da água que pode seguir destinada para diversas finalidades (SILVA et al., 2013).

Ituassu et al. (2004) destacam que em sistema de privação alimentar na fase inicial da produção, o tambaqui apresenta crescimento compensatório e melhor deposição de proteínas corporal a partir do momento em que encerra a privação alimentar e o alimento passa a ser ofertado à vontade.

A fase de engorda dessa espécie dura em torno de 240 a 300 dias, período que sofre influência da disponibilidade de alimento, densidade de estocagem e temperatura da água, que pode variar de 1 a 1,5 peixes/m³, influenciando diretamente no melhor desempenho dos peixes (ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002; ARAÚJO-LIMA & GOMES, 2005; IZEL et al., 2014).

Apesar de o tambaqui conseguir se alimentar do zooplâncton encontrados na água dos viveiros, a fase de desenvolvimento e crescimento destes peixes depende da ração ofertada, sendo que para cada fase da produção (crescimento ou terminação) existem rações com balanços nutricionais específicos (IZEL et al., 2014).

Na fase de terminação, os peixes devem alcançar o peso comercial de 2,7 kg a 3,3 kg. Alcançado o peso ideal para a comercialização, a carne desta espécie apresenta ótimos resultados de venda (VALENTI et al., 2000; IZEL et al., 2014).

Aos peixes destinados a reprodução Streit Junior et al. (2012) recomendam que a densidade de estocagem deve ser menor, 0,2 peixe/m² para matrizes e reprodutores de menor porte (com até 3 kg) até 0,1 peixe/m² para peixes de maior porte. Para a alimentação dessas matrizes, recomenda-se que o nível proteico da ração seja em torno de 28% de proteína bruta para a fase de manutenção e 36% quando estiverem na fase de vitelogenese.

Devido ao maior porte do tambaqui, existe uma dificuldade relacionada ao manejo reprodutivo no momento da captura e indução hormonal exógena. Quanto maior o exemplar, mais dificultoso será o manuseio e maior será a quantidade de hormônios necessários para indução. Preconiza-se que os peixes para reprodução tenham em média 3 kg para facilitar o manejo e reduzir os custos (ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002; STREIT JUNIOR et al., 2012).

Na natureza, a fase reprodutiva do tambaqui coincide com a época migratória ou piracema, de setembro a fevereiro com desovas totais que coincidem com as cheias dos rios Negro e Amazonas. A piracema é caracterizada pela migração lenta dos cardumes adultos em direção à cabeceira dos rios e afluentes. Esse período migratório é necessário para peixes reofílicos, a exemplo do tambaqui, os quais são dependentes de estímulos ambientais para estimular a produção de hormônios para induzir a produção espermática nos machos e o amadurecimento das gônadas para a ovulação (MACIEL, 2015).

Quando criada em cativeiro é necessário que ocorra a indução hormonal exógena, uma vez que sem o estímulo ambiental e migratório, não ocorre o desencadeamento de fatores fisiológicos. O extrato bruto de hipófise de carpa (EBH), por apresentar praticidade na sua manipulação e eficácia nos resultados, é o mais utilizado para a indução artificial da reprodução em peixes reofílicos. A dose de EBH a ser injetada precisa ser calculada de acordo com o peso corporal do peixe macho, sendo indicado 1 mg/kg para peixes menores (até 3,0 kg) e 2,5 mg/kg para peixes maiores (acima de 3,0 kg), sendo administrada em dose única cerca de 12h a 14h antes da coleta seminal (MARIA et al., 2011; STREIT JUNIOR et al., 2012).

A indução da reprodução em peixes reofílicos é feita na maioria das vezes pela aplicação de EBH, seja ela em dose única ou múltiplas doses, porém outros hormônios também podem ser utilizados, a exemplo da gonadotrofina coriônica humana (HCG) ou hormônio liberador de hormônio luteinizante (GnRH) (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

O início da puberdade pode ocorrer mais precocemente nos machos em relação as fêmeas, quando mantidos em cativeiro, sendo evidenciado desde os cinco meses de idade o desenvolvimento testicular, espermatogênese e espermição, e apresenta fim do primeiro ciclo reprodutivo antes de atingir os 3 kg (peso de mercado), enquanto que nas fêmeas esse processo fisiológico da reprodução inicia-se após sete meses de idade (SOUZA & ALMEIDA, 2012; ALMEIDA et al., 2016).

Em estudo realizado por Lopes et al. (2012) também foi evidenciado a precocidade dos machos, onde pode-se perceber que a espermatogênese teve início cerca de 4 meses antes da maturação completa dos testículos, que ocorre nos meses de Dezembro e Janeiro, com evidenciação de presença de espermatozoides no lúmen testicular. A duração da espermatogênese, processo onde células diplóides passam por proliferação e diferenciação em células maduras, também é menor em peixes do que em mamíferos, estando sujeitas às mudanças de temperatura da água (NÓBREGA et al., 2009).

2.2 Avaliações Espermáticas

Devido à particularidade de cada espécie e até mesmo entre a mesma espécie, os conhecimentos destas características seminais são extremamente importantes para determinar a qualidade reprodutiva destes animais, e desta forma, aperfeiçoar o uso destas técnicas para a utilização em sistemas de reprodução artificial em larga escala (MURGAS et al. 2011).

2.2.1 Motilidade Espermática

Na produção comercial de peixe, em micro ou macro empreendimentos, é indispensável avaliar a qualidade do sêmen dos animais para que se possa aumentar a eficiência da fertilização artificial e a produção total (RURANGWA et al., 2004).

A motilidade espermática é o principal parâmetro reprodutivo quando se deseja avaliar a qualidade do sêmen coletado dos peixes (VIVEIROS & GODINHO, 2009). A classificação de motilidade determinada em porcentagem de espermatozoides em movimento no campo de visão é um método eficaz e prático (VIVEIROS et al., 2003).

Embora existam diferenças morfológicas entre as espécies de peixes, a característica da motilidade espermática é comum a todas as espécies. O mecanismo de ativação dos espermatozoides nestas espécies ocorre quando entram em contato com a água, seja do rio, do viveiro aquícola ou do para hidratação, quando em reprodução artificial. Os espermatozoides, enquanto armazenados nos testículos, encontram-se imóveis e na forma inativa, sugerindo que fatores químicos dos testículos ou fluidos seminais são responsáveis por isso (STOSS, 1983; CARNEIRO, 2007).

Os óvulos de peixes de água doce de fecundação externa, quando em contato com a água iniciam o processo de fechamento da micrópila, a qual permanece aberta por curto período, cerca de 2 minutos, permitindo a entrada dos espermatozoides e fecundação (HOLT & VAN LOOK, 2004).

Uma vez ativada pelo contato físico com a água, a ativação se torna irreversível e apresenta esta característica de duração de motilidade muito curta, devido as suas baixas reservas energéticas. A longevidade dos espermatozoides após a ativação, assim como a sua capacidade fertilizante, está diretamente ligada ao ambiente externo aos quais estarão sendo expostos, pois ficam expostos ao estresse osmótico do meio: hipotônico, quando em água doce, e hipertônico, quando de águas salobras (HOLT, VAN LOOK, 2004; CARNEIRO, 2007).

A essa característica peculiar do processo de ativação espermática em peixes, vale ressaltar que há grandes chances de os espermatozoides serem inativados durante a coleta devido a contaminação da amostra, seja ela decorrente de contato direto com urina, sangue, solução sedativa e secreções extravasados no momento da massagem abdominal, ou através de contato com utensílios de coleta sujos (resíduos de sabão, álcool ou material de limpeza)

ou úmidos, bem como a alterações abruptas de temperatura na recepção do material fresco (BARTH, 2000; PEREIRA et al., 2016).

O conhecimento destas características em cada espécie é crucial para o sucesso da técnica, uma vez que a fertilização dos óvulos só acontece quando os espermatozoides têm sua motilidade ativada, por isso que a motilidade espermática é um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a qualidade espermática, sendo esta influenciada diretamente por fatores ambientais (como temperatura e estação do ano), fatores nutricionais, genéticos (espécie) e até mesmo pelas condições no momento da coleta e metodologia empregada nas soluções ativadoras (CARNEIRO, 2007; MURGAS et al. 2011).

Rurangwa et al. (2004) ressaltam que o uso desse parâmetro para avaliar a fertilidade de peixes machos é questionável devido ao fator de ser um parâmetro subjetivo, ou seja, esta estimativa da qualidade do sêmen pode ser afetada por fatores relacionados com a experiência do profissional, pontos de observação escolhidos e medidas de interpretação de resultados que foram escolhidos.

O sêmen de tambaqui induzidos com Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) na dosagem de 100 mg/kg de peso vivo por via intraperitoneal apresentaram motilidade 4, comparada com a motilidade 2, observada nos peixes que não foram induzidos, e que em algumas amostras apresentou-se mais espesso e com presença de grumos (FARIAS et al., 1999). Em machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) cerca de 91,7% dos peixes apresentou motilidade abaixo de 80%, conforme observações de Campos et al. (2010).

2.2.2 Vigor

O vigor espermático é outro parâmetro importante a ser avaliado em conjunto com a motilidade espermática. É utilizado para qualificar a movimentação dos espermatozoides, sendo considerado no momento da avaliação a velocidade e a progressão do movimento dos espermatozoides (CBRA, 2013).

A avaliação subjetiva do vigor é determinada em uma escala de 0 a 5, quando o escore 0 é atribuídos aos espermatozoides que não apresentam movimentação ou progressão fraca e inexpressiva, seguido dos escores 1 a 4 quando apresentam movimentação e progressão intermediários, e escore 5 quando a motilidade está entre 80% a 100% (VIVEIROS et al., 2003; CBRA, 2013).

2.2.3 Volume

O volume total do ejaculado depende de fatores como: método de coleta, indução hormonal, espécie, excitação no manejo e até mesmo entre animais da mesma espécie; não existindo um volume mínimo e máximo (VIVEIROS & GODINHO, 2009; CBRA, 2013).

Viveiros e Godinho (2009) destacaram que a avaliação do volume seminal de peixes é um fator extremamente importante no processo reprodutivo destes animais e que tanto em espécimes de piracema quanto em espécimes induzidos, este volume seminal pode ser bastante variável entre as espécies e épocas do ano. Estes mesmo autores mencionam que apenas uma parte do sêmen é possível de ser extraído durante procedimentos rotineiros de coleta através de massagem abdominal, e que este volume seminal em algumas espécies pode ser relativamente grande (superior a 10 mL), como exemplo a Piracanjuba (*Brycon Orbignyanus*). Em contrapartida, outras espécies como piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) e jaú (*Zungaro Jahu*), estes procedimentos rotineiros de massagens abdominais não simples de realizar, sendo necessário intervenção cirúrgica e remoção testicular para coleta de sêmen intratesticular em alguns dos machos.

O volume seminal em pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*) manejados por Velarde (2013) foi em média $9,0 \pm 3,3$ mL, com volume seminal máximo 10 mL em coleta realizada em dezembro e volume de $4,6 \pm 1,5$ mL em coleta realizada em novembro, após indução dos exemplares com GnRH em dose única de 0,5 mg/kg de peso vivo.

Tambaquis induzidos e não induzidos com GnRH 100 mg/kg de peso vivo, Farias et al. (1999) encontraram volumes seminais de $5,0 \pm 1,2$ mL e no grupo dos animais não induzidos foi observado volume médio de $2,0 \pm 0,8$ mL. Valores semelhantes aos encontrados por Vieira (2011) em se tratando de animais induzidos com EBH na dosagem de 2 mg/kg de peso vivo e apresentaram $5,05 \pm 2,00$ mL de volume seminal, com valores médios inferiores $0,55 \pm 0,5$ mL obtidos com peixes não induzidos.

O volume seminal apresentou media de 12,6 mL no grupo de tambaquis induzidos com duas doses intramusculares de 0,25 e 2,5 mg/kg por peso vivo e média de 0,5 mL nos tambaquis não induzidos (MARIA et al., 2011).

2.2.4 Aspecto

O aspecto seminal deve ser avaliado de forma visual e subjetiva, caracterizando a cor e a aparência do ejaculado, que depende diretamente da concentração espermática e resíduos de sangue, fezes, urina, células epiteliais, água e outros detritos encontrados no ejaculado, que podem ser decorrentes do manejo no momento da massagem abdominal. O ejaculado pode ser classificado como cremoso, seroso, leitoso e aquoso (CBRA, 2013). O sêmen de tambaqui apresenta característica leitosa e acentuadamente viscoso, conforme descrito por Menezes et al. (2008). A caracterização feita por Maria et al. (2011) ao aspecto seminal de sêmen de tambaquis induzidos e não induzidos foi o mesmo - branco e leitoso. A mesma característica foi observada por Pinheiro et al. (2016) para o sêmen fresco de tambaqui, coloração esbranquiçada e aspecto leitoso.

2.2.5 Concentração Espermática

A concentração espermática é utilizada para determinar o número total de espermatozoides do ejaculado por milímetro cúbico (mm^3) ou centímetro cúbico (cm^3) através da contagem de células na câmara de Neubauer (CBRA, 2013). Viveiros e Godinho (2009) mencionam que a mensuração da concentração espermática é crucial no estudo de características reprodutivas de peixes e destaca que o número de espermatozoides por mL apresenta grandes variações em espécies de água doce, influenciados por indução hormonal, manejo e época do ano, além de outros fatores intrínsecos e extrínsecos.

A concentração espermática em piapara (*Leporinus obtusidens*) e jundiá induzidos variou de $10,9 \times 10^9$ espermatozoides/mL a $69,9 \times 10^9$ espermatozoides/mL, respectivamente (VIVEIROS, GODINHO, 2009).

O linguado do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*), conhecido pelo alto valor comercial e grande potencial aquícola, apresentou concentração espermática de $15,6 \times 10^9$ espermatozoides/mL quando mantido em fotoperíodo normal (BABIÁK et al., 2006).

Velarde (2013) avaliando as características seminais e criopreservação sêmen de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), uma espécie com ampla distribuição na América do Sul e alto valor comercial no mercado regional, observou concentração espermática média de $111,46 \times 10^9 \pm 6,71 \times 10^9$ espermatozoides/mL coletados durante o mês de dezembro (meio do período reprodutivo) e $85,70 \times 10^9 \pm 35,49$ espermatozoides/mL coletados no mês de

novembro de 2011 (início do período reprodutivo), ambos induzidos com dose única de GnRH 0,5 mg/kg de peso vivo.

O sêmen de tambaqui apresentou concentração espermática em torno de 35×10^9 espermatozoides/mL., conforme informações apresentadas por Menezes et al. (2008), em contrapartida, Farias et al. (1999) encontraram concentrações espermáticas médias $6,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL em peixes induzidos com GnRH a 100 mg/kg de peso vivo.

2.2.6 Viabilidade Espermática

O método de coloração à base de eosina-nigrosina é utilizado para avaliar se os espermatozoides estão vivos ou mortos e se o ejaculado encontra-se viável para a reprodução (BARTH & OKO, 1989). A eosina possui a característica de indicar quais membranas foram lesionadas, e com isso, possibilita a passagem do corante para o interior das células lesionadas, enquanto a nigrosina promove o contraste de fundo escuro para facilitar a visualização dos espermatozoides íntegros (BARTH, 2000; MARIA et al., 2011; ZANIBONI-FILHO, BALDISSEROTTO, 2015).

Nesse procedimento é preconizado que sejam pipetadas uma gota de sêmen e uma gota do corante, homogeneizando e aquecer em banho-maria a 37 °C durante 60 segundos, e em seguida, confeccionar um esfregaço. Todo o procedimento deve ser realizado em menos de um minuto. A leitura da lâmina, a contagem e a classificação de 200 células devem ser feitas em microscópio óptico em objetiva de imersão, e apenas resultados iguais ou superiores a 70% são considerados viáveis para a reprodução e criopreservação (MARIA et al., 2011; CBRA, 2013).

2.2.7 Morfologia Espermática

A morfologia, assim como a viabilidade das células espermáticas, é um dos indicadores de fertilidade em machos, podendo ser definida como o estudo anatômico detalhado dos espermatozoides (BARTH, 2000; FRENEAU, 2011; ARRUDA et al., 2015)

As classificações destas anormalidades morfológicas podem variar entre resultados de trabalhos conduzidos por diferentes pesquisadores, podendo ser classificada em defeitos primários quando forem decorrentes de alterações morfofisiológicas ocorridas durante o processo de espermatogênese, e defeitos secundários quando decorrentes de alterações após a formação dos espermatozoides dentro do epidídimo ou durante o manejo no momento da

coleta. Blom (1973) sugere que estas anormalidades também podem ser classificadas em defeitos maiores, relacionando-os com sua importância na fertilidade ou devido a uma condição patológica testicular ou epididimária, decorrentes de falhas na espermatogênese, maturação e transporte espermático, capaz de interferir negativamente na fertilidade. Os defeitos menores, oriundos de desvios de forma, são provenientes de alterações estruturais pouco relevantes.

Esta classificação sugerida por Blom (1973) destaca que o tipo de alteração morfológica sempre determina a sua origem e seu efeito na fertilidade, e conseqüentemente, facilita a tomada de decisão para a correção e prevenção da causa.

Para esta avaliação morfológica os espermatozoides devem ser preparados através de esfregaços corados ou úmidos com contagem de células em microscopia de fase ou interferência diferencial. Os espermatozoides são translúcidos em campo claro, sendo necessário confeccionar esfregaço corado para visualização microscópica, a técnica de preparação úmida é a mais indicada em avaliações convencionais devido a sua praticidade e eficiência (BARTH, 2000; CBRA, 2013).

Para realizar a contagem das células com alterações morfológicas, é preconizada a contagem de 200 células individuais e apenas um defeito por célula que se encontra com alteração morfológica e, caso haja células com duas ou mais alterações, o registro deve ocorrer de acordo com a prioridade, ou seja, sempre preconizando os defeitos maiores em relação aos menores e se, além disso, houver células com duas alterações morfológicas de mesma classificação, é dada prioridade aqueles defeitos de maior frequência (FRENEAU, 2011; CBRA, 2013).

Todas as células contadas devem ser classificadas com seus devidos defeitos morfológicos (maiores e menores), de acordo com as alterações de forma e estrutura encontrada (BLOM, 1973; CBRA, 2013).

De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), animais com índice de anormalidades espermáticas acima de 30% em bovinos e equino e de 20% em ovinos e suínos não são recomendados para procedimentos de inseminação artificial ou monta natural, podendo comprometer a fertilidade e eficiência reprodutiva. A inexistência de tais parâmetros para peixes, a porcentagem aceitável de patologias para peixes ainda não foi determinada.

Segundo Arruda et al. (2011) resultados morfológicos com alta porcentagem de espermatozoides anormais pode interferir na fertilidade dos animais. Apesar de ser uma

técnica eficaz, esta não pode ser usada como ferramenta para mensurar a funcionalidade da célula.

A avaliação espermática de tambaqui ao longo da estação reprodutiva demonstrou que as anomalias observadas por Galo (2013) são principalmente defeitos morfológicos primários que estão relacionados aos processos de envelhecimento e renovação celular dos espermatozoides dos peixes coletados no final da estação reprodutiva, devido ao longo período de estocagem de gametas no interior das gônadas. Em contrapartida, os melhores resultados foram observados nos animais que tiveram sua coleta realizada entre os meses de novembro e dezembro, período inicial de espermiacção. Estas alterações morfológicas podem comprometer o desempenho reprodutivo destes peixes, evidenciando o momento ideal para coleta e manejo reprodutivo da espécie.

2.2.8 Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal de peixes é conceituado por fornecer um ótimo ambiente de estocagem de espermatozoides e, diferentemente da morfologia da maioria dos mamíferos, as glândulas acessórias são ausentes nos peixes e, por esta razão, a composição do plasma seminal não sofre alteração pela participação variável destas glândulas acessórias, tendo apenas influencia do ducto testicular e espermático (LAHNSTEINER et al., 1993, 1995; LAHNSTEINER, 2003; CIERESZKO, 2008).

Em peixes teleósteos, as proteínas são os principais compostos orgânicos do plasma seminal, com concentrações variando de 100 a 300 mg/100 mL de fluido seminal (LOIR et al., 1990; LAHNSTEINER et al., 1998, 2004; CIERESZKO et al., 2017), porém, as funções destas proteínas seminais ainda são pouco conhecidas (KOWALSKI et al., 2003). Lahnsteiner et al. (2004) mostraram que os componentes do plasma seminal atuam em diferentes maneiras na fisiologia seminal.

Além da composição rica em proteínas, o plasma seminal de peixes contém enzimas catabólicas que atuam no processo de eliminação de células espermáticas envelhecidas (LAHNSTEINER et al., 2004), além de servir de fonte energética e proteção antioxidante e contra ataques proteolíticos da motilidade e viabilidade espermática (CIERESZKO et al., 2017).

No grupo proteico encontrado no plasma seminal que é responsável pela proteção espermática, algumas proteínas já foram identificados como as lipoproteínas (LOIR et al., 1990), apolipoproteínas (NYNCA et al., 2010), transferrinas e alfa-antiproteinasas

(WOJTCZAK et al., 2005, 2007a,b), sugerindo forte relação de sua função protetora aos espermatozoides por essas proteínas de fase aguda (CIERESZKO et al., 2017).

Em estudo com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ficou demonstrado que seu plasma seminal contém um grande número de glicoproteínas denominadas SPP120 (seminal plasma glycoprotein 120), um homopolímero com ação imobilizadora sobre os espermatozoides (MOCHIDA et al., 2002).

Campos et al. (2010) identificaram 14 bandas proteicas de pesos moleculares variando de 217,1 kDa a 7,1 kDa, em sêmen de jundiá com uso da técnica de eletroforese, e após análises das bandas proteicas chegaram a conclusão as proteínas plasmáticas com peso molecular de 38,3 kDa estavam associadas à baixa motilidade espermática, uma vez que sua presença ocorreu em 91,4% dos peixes que apresentaram motilidade abaixo de 80% no teste andrológico.

Estudos de proteômica de plasma seminal de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (NYNCA et al., 2014) e carpa comum *Cyprinus carpio* (DIETRICH et al., 2014) por eletroforese unidimensional e cromatografia líquida, possibilitou a criação de uma lista ampla de proteínas encontradas no plasma seminal de peixes, com a identificação de 152 proteínas em truta arco-íris e 186 proteínas em carpa comum.

Uma correlação entre a composição das proteínas encontradas pela caracterização do plasma seminal de truta arco-íris (NYNCA et al., 2014) e carpa (DIETRICH et al., 2014), sugere a existência de mecanismos de defesa no sêmen de peixes teleósteos. Embora as proteínas sejam individuais e mesmo sendo do mesmo grupo, parecem atuar de forma diferente e, certas proteínas mostraram ser espécie específica, como as do tipo precerebelina em trutas arco-íris (CIERESZKO et al., 2017).

O grupo proteico identificado em plasma seminal de carpa por Dietrich et al. (2014), mostrou que 62% destas proteínas estavam relacionadas com processos metabólicos como: o ciclo do ácido tricarbóxico, metabolismo dos aminoácidos, processo oxidativo dos ácidos graxos, respiração metabólica, glicose e gluconeogênese, correlacionando a maioria desses processos enzimáticos com a produção energética de ATP e, conseqüentemente, com a motilidade espermática, uma vez que caracterizam como sendo um pré-requisito para o movimento espermático.

Usando a eletroforese unidimensional em jumentos pré-púberes e púberes da raça Pêga, Abreu (2016) detectou uma média de 24 bandas proteicas em jumentos pré-púberes e 22 bandas em púberes, com predominância de bandas proteicas com peso molecular de 66 kDa, semelhantes ao peso molecular da albumina.

Os principais componentes proteicos do plasma seminal de bovinos são as proteínas designadas BSP, como BSP-A1, BSP-A2, BSPA3 (15 a 17 kDa) e BSP-30 (28 a 30 kDa) secretadas pela vesícula seminal e relacionadas com a capacitação espermática. Esse grupo corresponde de 50% a 65% do total de proteínas do plasma seminal bovino e estão estritamente relacionadas com a fertilidade nesta espécie (MANJUNATH, 1984; THÉRIEN et al., 1998).

Em estudo de proteômica, Druart et al. (2013) identificaram ao todo 302 proteínas do plasma seminal de carneiro, touro, cabra, cervídeo, camelo, cavalo e alpaca, sendo que as proteínas pertencentes ao grupo BSP (*Binder of Sperm Protein*: Nucleobindin1 e RSVP14) foram identificadas em todas as espécies.

A caracterização das proteínas do plasma seminal de peixes pela eletroforese unidimensional, que permite separar as proteínas pelo seu ponto isoelétrico, pode servir para indicar quais proteínas seriam úteis como potenciais marcadores bioquímicos, podendo ser associados com fatores ligados à fertilidade, congelabilidade do sêmen e identificação de animais com melhor desempenho reprodutivo em diversas épocas do ano (DRUART et al., 2013; GALO, 2013; CIERESZKO et al., 2017).

3 CONSIDERAÇÕES

A caracterização de aspectos reprodutivos do tambaqui com base em suas diferentes vertentes possibilitaria a evolução de estratégias de manejo e nutricionais para elevar a qualidade seminal e fertilidade de machos.

Aspectos intrínsecos ao sêmen: motilidade espermática (em percentual), vigor (escala sugestiva 0 a 5), volume (mL/kg de peso vivo), concentração espermática (número de espermatozoides/mL de sêmen), viabilidade espermática (percentual de espermatozoides lesionados e íntegros), morfologia (tipos e percentuais de defeitos nos espermatozoides), somados à qualidade do sêmen com base em análise proteômica de sua composição. Mostram-se como ferramentas essenciais para estudos reprodutivos com tambaqui e demais espécies nativas de importância econômica para a aquicultura brasileira.

Uma percepção de que seja provável existir correlação entre o manejo nutricional e a fertilidade, com a proposição de linhas de estudo para ajustar as dietas a fim de melhorar a qualidade do sêmen.

A elevação da qualidade seminal dos machos, juntamente com os avanços de desempenho zootécnicos proporcionado por programas de melhoramento genético na espécie,

possibilitarão o desenvolvimento de uma cadeia de criopreservação de sêmen de tambaqui e outras espécies aquícolas. A economia em infraestrutura, mão de obra e insumos para a manutenção de plantéis machos por piscicultores que trabalham produzindo alevinos poderia ser revertida em ganhos de área para elevar a produção e manutenção de plantel de fêmeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. A. A.; TEIXEIRA GOMES, M. G. T. ², MOURA, A. A. A. N. **Caracterização de proteínas do plasma seminal de asininos da raça pêga**. III seminário integrado de ensino, pesquisa, extensão e cultura – UFT, 2016.

ALMEIDA, F. L.; LOPES, J. S.; CRESCENCIO, R.; IZEL, A. C. U.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. **Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight**. *Aquaculture*, 452, 224-232, 2016.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L.C. **Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFMS. p. 175-202, 2005.

ARBELAEZ- ROJAS, G.A.; FRACALOSSO, D.M.; FIM, J.D.I. **Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Bryconcephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi- intensivo, em viveiros**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.3, p.1059- 1069, 2002.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. **Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, 2015.

BABIAK, I., OTTESEN, O., RUDOLFSSEN, G., JOHNSEN, S.. **Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.I**. *Optimizing the protocol*. *Theriogenology*. 66(9), 2025-2035, , 2006.

BARTH, A. D. **Bull Breeding Soundness Evaluation**. Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 75 p. 2000.

BARTH, A. D. ; OKO, R. J. **Preparation of semen for morphological evaluation**. In: **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa State University Press., p.285, 1989.

BLOM, E. **The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram**. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-339, 1973.

BRASIL. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura; Portuguese. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf, 60p, 2011.

CAMPOS, V. F.; SEIXAS, F. K.; KAEFER, C.; CAVALCANTI, P. V.; AMARAL, M. G.; THOMAZ LUCIA JR, T.; JOÃO CARLOS DESCHAMPS, J. C.; COLLARES, T. **Association between the presence of a 38 kda factor in the seminal plasma and inhibition of sperm motility in jundiá fish *rhamdia quelen***. CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA, V. 11, N. 2, 2010.

CARNEIRO, P. C. F. **Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 49p. 2013.

CIERESZKO, A. **Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity, and cryopreservation success in fish**. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), Fish Spermatology. Alpha Science International Ltd., Oxford, U.K., pp. 215–240, 2008.

CIERESZKO, A.; DIETRICH, M.A.; NYNCA, J. **Fish semen proteomics — New opportunities in fish reproductive research**. Aquaculture 472, 81–92 , 2017.

DIETRICH, M.A.; ARNOLD, G.J.; FRÖLICH, T.; CIERESZKO, A. **In-depth proteomic analysis of carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa**. Comp. Biochem. Physiol.DGenom.Proteom.12, 10–15, 2014.

DRUART, X. ; RICKARD, J.P. , MACTIER, S. ; KOHNKE, P. L. ; KERSHAW-YOUNG, C. M . ; BATHGATE, R. **Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma**. J. Proteom;91:13e22, 2013.

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 pp., 2016.

FARIAS, J.O., CARVALHO, M.A.M ., NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” do semen de Tambaqui, *Colossoma Macropomum*, conservado em agua de coco**. Rev. Cien. Prod. Anim. 1, 44-58, 1999.

FRENEAU, G. E. **Aspectos da morfologia espermática em touros**. Rev Bras Reprod Anim, v.35, p.160-170, 2011.

GALO, J. M. **Avaliação da qualidade dos gametas de tambaqui(*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva**. Tese (doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 89 f, 2013.

GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. **Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish**. Rev. Bras. Zool., 1, pp. 107-133, 1982.

HOLT, W. V. ; VAN LOOK, K. J.W. **Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality**. Reproduction, 127 527-535, 2004.

IBGE. Tabela 3940 – **Produção da aquicultura, por tipo de produto (notas)**. [HTTPS://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940](https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940). Acesso em 08/06/2017, 2016.

ITUASSÚ, D.R.; SANTOS, G.R.S.; ROUBACH, R.; PEREIRA-FILHO, M. **Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.39, n.12, p. 1199-1203, 2004.

IZEL, A. C. U.; CRESCENCIO, R.; O'SULLIVAN, F. L. A.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. de L. Cultivo do tambaqui no Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

KOWALSKI, R.; GLOGOWSKI, J.; KUCHARCZYK, D. et al. **Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts**. Journal of Fish Biology, v.63, p.1008-1019, 2003.

KUBITZA, F. **Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos**. *Panorama da aquicultura*. v.12, n.82, p 27-39, 2004.

LAHNSTEINER F, WEISMANN T, PATZNER RA. **Evaluation of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism**. Aquaculture ;163:163–81, 1998.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. **Fine structure and motility of spermatozoa and composition of seminal plasma in the perch**. J. Fish Biol. 47, 492–508, 1995.

LAHNSTEINER, F., PATZNER, R.A., WEISMANN, T. **The spermatid duct of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion**. J. Fish Biol. 42, 79–93, 1993.

LAHNSTEINER, F.. **Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatid ducts in marine fish**. Tissue Cell 35, 363–373, 2003.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. **Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa**. Theriogenology, v.62, p.801-808, 2004.

LOIR, M. ; LABBE, C. ; MAISSE, G. ; PINSON, A. ; BOULARD, G. ; MOUROT, B. **Proteins of seminal fluid and spermatozoa in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): partial characterization and variations**. Fish Physiol Biochem;8:485–95, 1990.

LOPES, J. ; CHAGAS, E. ; CRESCENCIO, R. ; MORAIS, I. ; ALMEIDA, F. **Espermatogênese de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) criado em cativeiro**. Congresso da sociedade brasileira de aquicultura e biologia aquática, 5., 2012, Palmas. Unir, consolidar e avançar: anais. Palmas: AQUABIO, 2012.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

MACIEL, M. A. P. M. **Cinética espermática, criopreservação do sêmen e composição bioquímica do plasma seminal de diferentes espécies de peixes Characiformes**. Tese

(doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2015.

MANJUNATH, P. **Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in bull seminal plasma**. In: Sairam MR, Atkinson LE (eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and their Biological Significance*. Singapore: World Scientific Publishing Company;: 49–61, 1984.

MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; CARNEIRO, P.C.F. **Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. *Comun. Téc.*, 112, p. 8, 2011.

MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P. ; CARNEIRO, P.C.F. **Indução hormonal e características do sêmen tambaqui *Colossoma macropomum***. *Zygote*, 1, pp. 1-5, 2011.

MENEZES, J.T.B.; QUEIROZ, L.J; DORIA, C.R.C. et al. **Avaliação espermática pósdescongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**. *Acta Amazonica*, v.38, p.365-368, 2008.

MOCHIDA, K.; MATSUBARA, T.; ANDOH, T. et al. **A novel seminal plasma glycoprotein of a teleost, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), contains a partial von willebrand factor type D domain and a zona pellucida-like domain**. *Molecular Reproduction and Development*, v.62, p.57-68, 2002.

MORAIS, I. S.; O’SULLIVAN, F. L. A. **Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816)**. *Scientia Amazonia*, v. 6, n. 1, 81-93, 2017.

MURGAS, L.D. S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS. G.C. **Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.186-191, 2011.

MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS G.C. **Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.186-191, 2011.

NÓBREGA, R.H., BATLOUNI, S.R., FRANÇA, L.R. **An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish**. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 197–206, 2009.

NYNCA, J., ARNOLD, G.J., FRÖLICH, T., OTTE, K., FLENKENTHALER, F., CIERESZKO, A. **Proteomic identification of rainbow trout seminal plasma proteins**. *Proteomics* 14, 133–140, 2014.

NYNCA, J., DIETRICH, M.A., KAROL, H., CIERESZKO, A. **Identification of apolipoproteins C-I in rainbow trout seminal plasma**. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1183–1187, 2010.

PEREIRA, P. N. B.; SILVA, A. C.; TEIXEIRA³, E. G.; FARIAS, W. R. L. **Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. v.10, n.3, p. 415 – 435, 2016.

PINHEIRO, J. P. S.; LEITE-CASTRO, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. **Qualidade do sêmen de tambaqui**

(Colossoma macropomum) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.17, n.2, p. 267-273, 2016.

QUEIROZ, J.F., LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. **Embrapa e a aquicultura: demandas; prioridades de pesquisa (Embrapa and aquaculture: research demands and priorities)**. Brasília, Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), Brazil, 2002.

REIS, R. E. et al. **Fish Biodiversity and Conservation in South America**. *Journal of fish biology*, 2016.

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

SILVA, A.D.R.; SANTOS, R.B.; BRUNO, A.M.S.S.; SOARES, E.C. **Cultivo de tambaqui em canais de abastecimento sob diferentes densidades de peixes**. *Acta Amazonica*, 43: 517-524, 2013.

SOUZA, J. S. L.; ALMEIDA, F. L. **Desenvolvimento gonadal de tambaqui *Colossoma macropomum***. Anais da IX Jornada de iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental – Manaus. Documentos; 100 - 320 p. 2012.

STOSS J. **Fish gamete preservation and spermatozoan physiology**. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. *Fish physiology*, IX B. New York: Academic Press; p. 305e50, 1983.

STREIT, J. R. D. P.; POVH J, A.; FORNARI, D. C.; GALO, J. M.; GUERREIRO L. R. J.; OLIVEIRA, D. **Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui**. Embrapa, 29, Documento 212, 2012.

THERIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. **Bovine seminal plasma phospholipid binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm**. *Biol. Reprod.* 61,590-598, 1999.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura no Brasil**. CNPQ: MCT, Brasília, p. 399, 2000.

VELARDE, J. M. C. **Avaliação das características seminais e criopreservação do sêmen de *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriforme Pimelodidae)**. São José do Rio Preto: Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 83 f., 2013.

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do semen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes a base de água de coco em po (ACP-104)**. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias (Reprodução e Sanidade de carnívoros onívoros e aves) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 115p, 2010.

VIEIRA, M.J.A.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; SALGUEIRO, C.C. DE M.; VIVEIROS, A.T.M.; MOURA, A.A.A.N.; NUNES, J.F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. *Arch. zootec.* vol.60 no.232 Córdoba dic. 2011.

VIVEIROS, A. T. ; JATZKOWSKI, A. ; KOMEN, J. **Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*)**. Theriogenology. 59(9):1905-17, 2003.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. **Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review**. Fish Physiol Biochem.;35(1):137-150, 2009.

WOJTCZAK, M., CAŁKA, J., GLOGOWSKI, J., CIERESZKO, A. **Isolation and characterization of A1-proteinase inhibitor from common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma**. Comp. Biochem. Physiol. B 148, 264–276, 2007.

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J., CIERESZKO, A. **Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma**. Fish Shellfish Immunol. 19, 387–391, 2005.

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J., IRNAZAROW, I., JURECKA, P., SLOWINSKA, M., CIERESZKO, A.. **Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics**. Comp. Biochem. Physiol. B 148, 426–431, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E.; BALDISSEROTTO, B. **Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.1, p.189-194, 2015.

CAPITULO II

(Trabalho nas normas da revista **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**)

SHORT COMMUNICATION

VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM SÊMEN DE TAMBAQUI PELO USO DA COLORAÇÃO COM EOSINA-NIGROSINA

TAMBAQUI SPERM VIABILITY USING EOSIN-NIGROSIN STAINING

Ademir Pires Rodrigues¹, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes², Sandro Estevan Moron³, Pedro de Almeida Rezende Fumagalli⁴, Juliana Carvalho Anacleto⁴.

¹Pós-graduando no Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos trópicos da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins - Brasil. Email: ad.p.r@hotmail.com

² Professor no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins – Brasil. Email: mgianordoli@hotmail.com

³Professor no curso de Medicina da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins – Brasil.

⁴Graduando em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins – Brasil.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the methodology of the sperm viability test of two males of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Curvier 1818), six males of pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*), fifteen males of tilapia (*Tilapia rendalli*) and eight males of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Curvier 1818), with material collected on three different dates and different methodologies. It was evidenced that after modification of the procedure without the need to preheat the dye solution in a 37 ° C water bath and the use of the hotplate for the slides, there was low damage and better evidence of the sperm cells. It has also been shown that this sperm viability test can be used as an aid to confirm sperm motility in this species. These changes in the methodology are shown to be effective in determining the reproductive quality of these animals, and these procedures may be used in daily routine in piscicultures and future andrological research.

Keywords: fish, live stain, membrane integrity, morphology.

A qualidade seminal de peixes sofre influencia de fatores fisiológicos, nutricionais, sazonais, estímulo para reprodução (natural ou induzida) e da idade do reprodutor, necessitando da utilização de metodologias capazes de garantir a eficácia desse sêmen antes que seja utilizado (ZANIBONI-FILHO; BALDISSEROTTO, 2015).

O uso de parâmetros reprodutivos, como a viabilidade espermática, são ferramentas importantes para avaliar a variação na qualidade espermática de peixes (MARIA et al., 2011) que sofreram alterações estruturais nos espermatozoides (EMERICK et al., 2011).

Os espermatozoides são translúcidos e quase invisíveis quando visualizados em microscopia comum de campo brilhante, tornando difícil a avaliação do contorno celular, sendo necessária a coloração desses espermatozoides com corante vital e com contraste de fundo escuro para destacar as células que deseja avaliar (BARTH & OKO, 1989; BARTH, 2000), e assim proporcionar maior praticidade na qualificação desse material e promover bons índices reprodutivos.

O método de coloração espermática à base de eosina-nigrosina (BARTH & OKO, 1989) tem se mostrado eficaz para determinar a viabilidade de espermatozoides (vivos, não corados) ou inviáveis (mortos, corados em rosa). O teste se baseia na possível falha na permeabilidade de membrana e passagem de íons para dentro da célula, facilitando a penetração da eosina nas células danificadas, enquanto a nigrosina promove o contraste de fundo escuro facilitando a visualização das mesmas (BARTH, 2000; MARIA et al., 2011; CBRA, 2013; ZANIBONI-FILHO, BALDISSEROTTO, 2015).

Embora esse teste seja realizado rotineiramente, a viabilidade espermática é conceituada pela capacidade locomotiva dos espermatozoides e de fertilização dos ovócitos. A viabilidade espermática é preconizada para simplesmente indicar a integridade das membranas dos espermatozoides, pois os que apresentam membrana intacta (não corado) no teste pode ter sua viabilidade limitada por outros fatores (RURANGWA et al., 2004), não excluindo a necessidade de utilização de outros parâmetros reprodutivos, como motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

Mesmo que não existam avaliações e parâmetros espermáticos bem definidos para peixes, o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013) recomenda que após a homogeneização do sêmen com a solução corante, estes devem permanecer em banho-Maria a 37 °C por cerca de 60 segundos. Os esfregaços confeccionados devem ser delgados e feitos em lâminas previamente aquecidas a 37 °C em placas aquecedoras.

As amostras de sêmen foram coletas de machos de tambaqui (*Colossoma*

macropomum), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*). Dois machos de tambaqui tinham dois anos de idade, comprimento total médio de 50 cm e peso médio de 3,0 kg, os quais não foram estimulados para reprodução com aplicação de hormônios indutores e estavam sendo mantidos em viveiros escavados na Piscicultura Carajás, localizada em Estreito/MA, com amostras coletadas dia 01/julho-2016. Seis machos de pacu com três anos de idade, comprimento total de 60 cm e peso 4,2 kg, também mantidos na Piscicultura Carajás, não foram estimulados para reprodução com aplicação de hormônios indutores e tiveram amostras coletadas dia 01/julho-2016.

Amostras de sêmen também foram coletadas de 15 machos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com 1 a 2 anos de idade e peso entre 0,7 a 1,5 kg, não estimulados para reprodução com aplicação de hormônios indutores, pertencentes ao Laboratório de Morfologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais (LMBPN) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, e amostras coletadas dia 26/julho-2016.

Além do sêmen de oito machos de tambaqui estimulados para reprodução com aplicação de extrato bruto de hipofise de carpa (EBH, a 0,5 mg/kg), os quais tinham 2,5 anos de idade e peso médio de 4,1 kg, mantidos na aquicultura Fazenda São Paulo, localizada no município de Brejinho de Nazaré/TO, com coleta de amostras realizada dia 30/janeiro-2017.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do Tocantins (protocolo de número 23101.001692/2015-65).

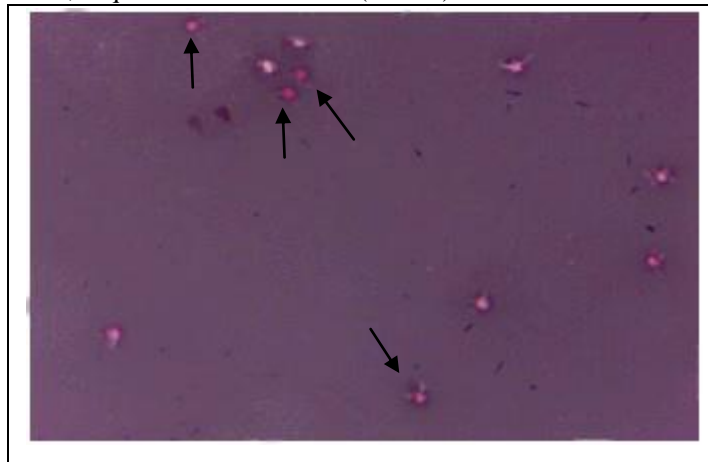
Na primeira coleta, com exemplares de tambaqui (n=2) e pacu (n=6), foi realizada a metodologia de coloração conforme preconizada pelo CBRA (2013). Entretanto, quando as lâminas e solução de eosina-nigrosina foram previamente aquecidas a 37 °C observou-se interferência na visualização e danos nas células espermáticas, alterando os resultados.

Na segunda coleta, com exemplares de tilápia (n=15), após confirmação da motilidade em microscópio de luz, foram pipetados 10 µL de sêmen e 10 µL do corante eosina-nigrosina (BARTH & OKO, 1989) em uma lâmina microscópica, homogeneizando-os e logo em seguida, foi confeccionado um esfregaço, deixando secar em temperatura ambiente (adaptado de CBRA, 2013). Todo o procedimento foi realizado em menos de um minuto, seguido da leitura das lâminas e contagem de 200 células em microscópio de luz em objetiva de imersão.

A execução da metodologia com as adaptações descritas anteriormente, possibilitou maior evidência das células espermáticas e menos danos às mesmas. A maior eficiência da

metodologia adaptada foi confirmada na análise de amostras de sêmen de tambaquis (n=8) na coleta realizada do dia 30/janeiro-2017, como visualizado a seguir (Figura 1).

Figura 1 - Esfregaço espermático de tambaqui (*C. macropomum*) corado com eosina-nigrosina: campo de leitura da lamina corada em microscópio de luz sob óleo de imersão. As setas demonstram as células mortas (inviáveis) coradas em rosa, enquanto as células vivas (viáveis) não são coradas.



Fonte: Arquivo pessoal.

A membrana plasmática destas células funciona como uma barreira entre os meios intra e extracelular, controlando a entrada e saída de íons e água, e neste caso, a entrada da eosina (FAUVEL et al., 2010).

Em sistema de cultivo, Izel et al. (2014) destacam que os tambaquis apresentam desenvolvimento favorável em águas com temperaturas em torno de 27 °C a 30 °C. Desta forma, o tempo necessário para homogeneização do sêmen com o corante, acrescido do tempo de aquecimento e temperatura do banho-Maria (37 °C), conforme a metodologia executada e preconizada pelo CBRA (2013) para sêmen de mamíferos, foi superior à temperatura ótima da água do tanque (28 °C). Esta elevação na temperatura (superior a 30 °C) pode ter interferido na permeabilidade das membranas, causando a maior entrada de eosina e água para dentro das células, ocasionando as alterações de membrana que comprometeram os resultados observados nas amostras de tambaqui e pacu preparadas e avaliadas na primeira fase.

Os resultados obtidos na última amostragem usando a metodologia ajustada, com espécimes na estação reprodutiva e que receberam indução hormonal, foi percebido melhora na qualidade seminal, como podem ser observações sumarizadas a seguir (Tabela 1) para a média de viabilidade espermática encontradas nas leituras das lâminas coradas com eosina-nigrosina.

Tabela 1 - Viabilidade espermática mensurada pela avaliação em microscopia de luz e teste de eosina-nigrosina pelo método adaptado de preparo sem aquecimento em sêmen fresco de machos de tambaqui.

Parâmetro	Média (n=8)	Mínimo	Máximo
Viabilidade espermática (percentual de espermatozoides vivos)	84,5 ± 4,5%	79,0%	91,5%

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

Os valores médios encontrados (84,5%) estão acima do limite mínimo de aceitação, onde apenas resultados iguais ou superiores a 70% são considerados viáveis para a reprodução, não prejudicando a fertilidade dos animais (MARIA et al., 2011; CBRA, 2013). No entanto, devido a subjetividade desse parâmetro e por não existir valores estabelecidos, essa classificação pode sofrer alterações entre pesquisadores.

Além de possibilitar avaliar a viabilidade espermática através da detecção das membranas intactas (viáveis), a coloração a base de eosina-nigrosina pode servir também para auxiliar na avaliação da motilidade espermática, uma vez que estão diretamente interligadas (BARTH, 2000), como demonstrado a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 - Motilidade e viabilidade espermática mensurada pela avaliação em microscopia de luz e teste de eosina-nigrosina, em sêmen fresco de machos de tambaqui.

Peixe	Motilidade (%)	Viabilidade espermática (% de espermatozoides vivos não corados)	Viabilidade espermática (% de espermatozoides mortos corados)
Macho 01	75	87,5	12,5
Macho 02	75	82,5	17,5
Macho 03	75	85,0	15,0
Macho 04	80	91,5	8,5
Macho 05	80	89,0	11,0
Macho 06	80	80,0	20,0
Macho 07	80	81,5	18,5
Macho 08	85	79,0	21,0
Média	78,8 ± 3,5	84,5 ± 4,5	15,5 ± 4,5

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

A associação entre as duas técnicas comprova a maior eficiência para determinar a qualidade espermática em peixes, mostrando ser uma ferramenta adicional nos procedimentos de rotina, a fim de assegurar a capacidade fertilizante do sêmen dos machos reprodutores que serão utilizados rotineiramente nas matrizes ou destinados à programas de melhoramento e criopreservação para conservação *ex situ* em bancos de germoplasma de espécies aquícolas.

Conclui-se que as alterações na metodologia proporcionaram impacto positivo na acurácia de mensuração das amostras de sêmen de peixes. Devendo essas alterações serem incorporadas nos procedimentos de rotinas nas avaliações de motilidade e viabilidade espermáticas de plantéis machos de peixes em pisciculturas ou pesquisas futuras com sêmen de tambaqui.

REFERÊNCIAS

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 49 p. 2013.

BARTH, A. D. **Bull Breeding Soundness Evaluation**. Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 75 p. 2000.

BARTH, A. D. ; OKO, R. J. **Preparation of semen for morphological evaluation. In: Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa State University Press., p.285, 1989.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; VALE FILHO, V. R.; SILVA, M. A.; ANDRADE, V. J.; LEITE, T. G.; MARTINS, J. A. M. **Avaliação de integridade de membrana de espermatozoides bovino criopreservado para prever o índice de prenhez**. Cienc. Anim. Bras., 12:536-546, 2011

IZEL, A. C. U.; CRESCENCIO, R.; O'SULLIVAN, F. L. A; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. L. Cultivo do tambaqui no Amazonas. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 51 p. **ABC da Agricultura Familiar, 36**.

MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; CARNEIRO, P.C.F. **Indução hormonal e características do sêmen tambaqui *Collossoma macropomum***. Zygote, v.1, pp. 1-5, 2011.

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

ZANIBONI-FILHO, E.;BALDISSEROTTO, B. **Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.1, p.189-194, 2015.

CAPITULO III

(Trabalho nas normas da revista **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**)

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PLASMA SEMINAL DE
TAMBAQUI**
**CHARACTERIZATION OF THE ELECTROPHORETIC PROFILE OF
SEMINAL PLASMA OF TAMBAQUI**

Ademir Pires Rodrigues¹, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes², Sandro Estevan Moron³,
Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura⁴, Fábio Roger Vasconcelos⁵, Arabela Guedes de Azevedo
Viana⁶, Tauane Catilza Lopes Fernandes⁶.

¹Pós-graduando no Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos trópicos da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins - Brasil. Email: ad.p.r@hotmail.com

²Professor no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins – Brasil. Email: mgianordoli@hotmail.com

³Professor no curso de Medicina da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína, Tocantins – Brasil.

⁴Professor no Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Brasil.

⁵Pós-doutorando no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Brasil.

⁶Pós-graduanda no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Brasil.

RESUMO

Avaliou-se parâmetros seminais e perfil eletroforético do plasma seminal de oito machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Curvier 1818), induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa (0,5 mg/kg), correlacionando-os como possíveis marcadores de qualidade seminal. O volume seminal médio foi de 3,31 mL/4,18 ± 0,46 kg de peso vivo com prevalência de aspecto leitoso (62,5%), motilidade (78,7%) e vigor (3,5). A concentração espermática média foi de 12,68 x 10⁹ espermatozoides/mL, a porcentagem média de defeitos menores (5,5%) e maiores (2,56%). Foi registrada a média 84,5% de células íntegras através do teste de eosina-nigrosina. Ao total foram encontradas 26 bandas proteicas com pesos moleculares de 9,87 a 221,93 kDa e picos de intensidades mais frequentes nas bandas com pesos moleculares de 56,94, 52,15, 19,89 kDa. A identificadas destas proteínas, principalmente as de baixo peso molecular, podem servir como marcadores de qualidade seminal e de fertilidade, além de auxiliar na seleção de peixes de elevada fertilidade para criopreservação de sêmen e

manutenção de gametas machos *ex situ* em programas de conservação ou na criação do bancos de germoplasma da espécie.

Palavras-chave: eletroforese unidimensional, peixes, proteômica, sêmen.

ABSTRACT

Was evaluated the seminal parameters and the electrophoretic profile of seminal plasma from eight male tambaqui (*C. macropomum*, Curvier 1818), induced with pituitary carp extract (0,5 mg/kg), were correlated as possible seminal quality markers. The mean seminal volume was 3.31 mL / 4.18 ± 0.46 kg of body weight with prevalence of milky appearance (62.5%), motility (78.7%) and vigor (3.5). The mean spermatic concentration was 12.68 x 10⁹ spermatozoa / mL, the mean percentage of minor (5.5%) and major (2.56%) defects. A mean of 84.5% of intact cells were recorded by the eosin-nigrosin staining. In total, 26 protein bands with molecular weights ranged from 9.87 to 221.93 kDa and peaks of more frequent intensities were found in bands with molecular weights of 56.94, 52.15, 19.89 kDa. Identification of these proteins, especially those of low molecular weight, can serve as markers of seminal and fertility quality, besides assisting in the selection of high fertility fish for cryopreservation of semen and maintenance of *ex situ* male gametes in conservation programs or in the germplasm banks of the species.

Keywords: fish, one-dimensional electrophoresis, proteomics, semen.

INTRODUÇÃO

Diante de diversos investimentos no setor da pesca e aquicultura no país, o novo relatório (Estado Mundial da Pesca e Aquicultura) publicado pela FAO (2016), aponta que o Brasil terá um crescimento estimado de 104% na produção aquícola até 2025 na América latina, seguido pelo México e Argentina com 54,2% e 53,9%, respectivamente.

Das espécies de peixes redondo do Brasil, a produção nacional de tambaqui (*Colossoma macropomum*) no ano de 2015 (IBGE, 2016) foi de 135, 9 mil t. A produção da região norte nos últimos anos mostraram-se favoráveis com produção total crescente, passando de 55,7 mil t em 2013 para 106,7 mil t em 2015. Quando comparada a produção anual entre as duas espécies líderes do mercado regional, o tambaqui e tilápia (*Oreochromis*

niloticus), esta última apresentou produção nacional de 239,1 mil t contra 137,0 mil t de tambaqui, evidenciando a importância econômica dessas espécies, o favoritismo e qualidade do produto (IBGE, 2016).

O tambaqui, pertencente à família Serrasalmidae e ordem Characiformes, é uma espécie de peixe migradora nativa de água doce encontrado na bacia Amazônica. Apresenta características favoráveis à sua criação em cativeiro como rusticidade, facilidade para manejo e crescimento compensatório acelerado. Devido a estes fatores inerentes ao cultivo, sua aceitação no mercado e favoritismo vem crescendo nas regiões norte e nordeste do país (KUBITZA, 2004).

A demanda regional, domínio de produção e reprodução, disponibilidade de mão de obra, facilidade de escoamento de produção regional e nacional fez com que o tambaqui fosse incluído entre as principais espécies classificadas como prioritárias para pesquisas, e desde 2008 compõe as espécies alvo do projeto de melhoramento genético incorporado ao Projeto AquaBrasil, com objetivo de ofertar linhagens superiores melhoradas geneticamente para ganho de peso superior, precocidade e eficiência reprodutiva e produtiva (MARIA et al., 2011).

Para a obtenção de exemplares selecionados e melhorados geneticamente, estudos reprodutivos (volume, motilidade, concentração e morfologia espermática, integridade de membrana e, estudos proteômicos) em gametas masculinos são fundamentais ao processo (VIEIRA et al., 2011).

O sêmen da maioria dos peixes teleósteos apresenta simplicidade morfológica e de acordo com Ciereszko et al. (2017) isso é propício para estudos de proteômica seminal quando comparados com seres vertebrados superiores.

As proteínas são os principais componentes de natureza orgânica do plasma seminal em peixes teleósteos e são encontradas em concentrações entre 100 a 300 mg/100 mL de fluido seminal (LAHNSTEINER et al., 2004). As proteínas contidas nos espermatozoides ou plasma seminal vêm sendo referenciadas como possíveis marcadores de fertilidades desses animais (AQUINO-CORTEZ et al., 2017).

A pesquisa dessas proteínas é baseada na sua separação pelo ponto isoelétrico por eletroforese em gel poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), as quais podem ser separadas de acordo com seu peso molecular (OLIVEIRA et al., 2007; CIERESZKO et al., 2017).

Os estudos com plasma seminal de peixes nativos do Brasil ainda são escassos, mesmo aos que apresentam importância e demanda comercial como o tambaqui, pirapitinga, pacu, pintado, cachara e pirarucu.

A condução deste trabalho teve objetivo de avaliar os parâmetros seminais de tambaqui e caracterizar as proteínas do plasma seminal a fim de associar possíveis indicadores de qualidade seminal e fertilidade na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas seminais ocorreram na aquicultura Fazenda São Paulo, localizada no município de Brejinho de Nazaré/TO, no dia 30/janeiro-2017. Oito machos de tambaqui com idade média de 2,5 anos foram utilizados para amostragem de fluido seminal. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do Tocantins (protocolo de número 23101.001692/2015-65).

Os peixes eram mantidos viveiros escavados de 800 m² (40 m de comprimento por 20 m de largura) com 1,5 m de profundidade. A temperatura da água na semana da coleta permaneceu entre 25 °C e 27 °C, a densidade de estocagem era de 0,2 peixe/m², os quais eram alimentados com ração comercial contendo 45% de proteína bruta, todos apresentavam ótimo estado de saúde e estavam em repouso reprodutivo, sendo esta a primeira coleta de sêmen realizada nestes reprodutores.

O estímulo para a reprodução artificial induzida foi realizado pela aplicação de dose única de extrato bruto de hipófise de carpa (EBH a 0,5 mg/kg de peso vivo) por injeção via intracelomática. Com 312 horas-graus após o processo de indução, realizou-se a sedação individual dos animais com Eugenol[®] pré-diluídos em etanol 92,8%, na dosagem de 1.330 mg/L, até o ponto de perda total do equilíbrio (ventre voltado para cima).

A coleta do sêmen ocorreu individualmente e cada macho foi retirado da água e envolto com um pano úmido e contido em decúbito lateral. A região urogenital foi lavada com água deionizada e seca com papel absorvente visando não contaminar a amostra de sêmen com resíduos de água ou urina. A punção do sêmen foi obtida pela massagem abdominal no sentido anteroposterior, o ejaculado foi coletado em tubos do tipo *falcon* de 15 mL para conferir o volume e o aspecto do ejaculado (CBRA, 2013). Em seguida o peixe foi devolvido para o tanque de manutenção para recuperação total da anestesia.

As avaliações de motilidade progressiva e vigor foram imediatas, 10 µL de sêmen *in natura* foi depositado em 490 µL de solução ativadora (água do tanque), seguindo a

metodologia preconizada pelo CBRA (2013). Em seguida, 10 µL da solução de sêmen ativada e 10 µL do corante eosina-nigrosina foram depositados e homogeneizados em um flagonete para confecção dos esfregaços, deixando secar em temperatura ambiente para posterior leitura em laboratório.

Para as avaliações posteriores, pipetou-se 10 µL sêmen que foi diluído em 490 µL de solução de coffin (RODRIGUEZ, 1992) para estimativa da concentração espermática em laboratório realizada em câmara de Neubauer (CBRA, 2013). A análise da morfologia espermática foi realizada com preparo de câmaras úmidas, depositando-se quantas gotas de sêmen fossem necessárias até aspecto turvo de em 490 µL do diluente de Coffin (RODRIGUEZ, 1992).

Na obtenção do plasma seminal, todas as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10.500 G, retirando-se o sobrenadante e procedendo imediatamente ao congelamento a -196°C em nitrogênio líquido.

No Laboratório de Morfologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins *campus* Araguaína, realizou-se a contagem dos espermatozoides para determinar a concentração espermática conforme metodologia do CBRA (2013). A lâmina corada com eosina-nigrosina foi analisada sob óleo de imersão em microscópio de luz, com contagem de no mínimo 200 células e registro as alterações de integridade de membrana, em que os espermatozoides com as células íntegras não coram, enquanto os inviáveis são corados em rosa (BARTH & OKO, 1989; CBRA, 2013).

A leitura para observação das alterações morfológicas foi feita em microscópio de contraste de fase com aumento de 1.000x, com a contagem de pelo menos 200 células, classificando-as com defeitos morfológicos do tipo maiores ou menores, segundo Blom (1973).

A determinação do perfil eletroforético foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará *campus* Fortaleza. Todas as amostras receberam inibidor de protease e foram submetidas à curva analítica de calibração pela reação de Bradford (BRADFORD, 1976). O gel unidimensional (1D) SDS-PAGE foi confeccionado de acordo com o gel de corrida com malha 12,5%, e o gel de concentração com malha 4%. A estimativa do peso molecular foi realizada com o marcador molecular Amersham ECL Rainbow Marker - Full Range (GE Healthcare[®], Buckinghamshire, UK) com pesos moleculares de 12 kDa a 225 kDa.

Os géis foram corados com Solução de Azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250, GE Healthcare®, USA), *overnight*. No dia seguinte, os géis foram digitalizados utilizando o ImageScanner II (GE Lifesciences, USA) e analisados utilizando o programa *QuantityOne*® versão 4.6.3 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Kingston Station, USA).

Os resultados foram submetidos à análise descritiva da presença das bandas proteicas do plasma seminal através da detecção de massas moleculares encontradas nos géis de eletroforese e as médias das características espermáticas comparadas pela ANOVA ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software Excel®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peixes utilizados nesse estudo eram mantidos exclusivamente para a reprodução e estavam acondicionados em viveiros escavados em baixa densidade (0,2 peixes/m²), por estarem em baixa densidade e consumindo rações com teor proteico (45% PB) acima do ideal para essa fase de cultivo (28% PB), a deposição de gordura foi favorecida (KUBITZA, 2004). Juvenis de tambaqui geneticamente superiores quando comparados com juvenis de plantéis comuns, apresentaram ganho de peso e crescimento semelhante, o que pode ser explicado pela baixa densidade influenciar positivamente o desempenho (BRANDÃO et al., 2004). Os valores encontrados de peso ($4,18 \pm 0,46$ kg) e comprimento ($60,87 \pm 3,56$ cm) são semelhantes aos observados por Vieira et al. (2011) e Pinheiro et al. (2016) nesta espécie.

Apesar de o volume seminal ($3,31 \pm 0,92$ mL/ $4,18 \pm 0,46$ kg de peso vivo) não ser alto, este não pode ser considerado como volume total, pois o volume do ejaculado pode ser variável de acordo com a espécie, época do ano, método de coleta e indução hormonal, não existindo um volume mínimo e máximo (FERREIRA et al., 2001; VIVEIROS, GODINHO, 2009; CBRA, 2013), podendo variar de 4 a 6 mL/ $6,12 \pm 0,41$ kg (PINHEIRO et al., 2016) a $12,6 \pm 4,7$ mL/ $7,0 \pm 1,0$ kg (MARIA et al., 2011).

Como demonstrado por Viveiros e Godinho (2009), o volume seminal de machos submetidos à indução hormonal sofre um aumento significativo, estando este ligado diretamente ao peso vivo do exemplar, uma vez que quanto mais pesado, maior será a dose hormonal a ser administrada, e conseqüentemente, maior será a hidratação gonadal e maior o volume produzido.

Os ejaculados apresentaram aspecto esbranquiçado, aspecto cremoso (37,5%) e leitoso (62,67%). Essas características são semelhantes às encontradas por Menezes et al. (2008), Maria et al. (2011) e Pinheiro et al. (2016) para sêmen de tambaqui no sêmen fresco. As

quais podem ser usadas como indicativos de características do padrão espermático do tambaqui.

A motilidade e vigor espermático são parâmetros reprodutivos que devem ser utilizados para avaliar a qualidade do sêmen de peixes (VIVEIROS, GODINHO, 2009). Sendo os valores de motilidade ($78,75 \pm 3,53\%$) e vigor espermático ($3,50 \pm 0,53$) mensurados neste estudo são semelhantes aos observados por Menezes et al. (2008) para o tambaqui. Observações realizadas por Maria et al. (2011) apontam motilidade média de 94,5% para peixes estimulados a reprodução com a aplicação de hormônio indutor (induzidos) e 89,1% nos não peixes não induzidos. As diferenças observadas devem-se à aplicação de duas doses de hormônio indutor (0,25 e 2,50 mg/kg) com intervalos de 8 horas, e coleta seminal após 330 horas-graus e temperatura da água a 27,5 °C, o que corresponde a doses superiores às aplicadas para este estudo e no estudo realizado por Menezes et al., (2008).

O mecanismo de ativação dos espermatozoides em espécies ovulíparas ocorre quando entram em contato com a água ou diluente, pois quando estão armazenados dentro dos testículos, estes permanecem inativados (imóveis). A ativação é irreversível e os espermatozoides ativados apresentam mobilidade por período muito curto, que varia de segundos a poucos minutos. Devido às reservas energéticas limitadas que são esgotadas rapidamente (STOSS, 1983).

Fatores relacionados com a contaminação da amostra por contato com urina, sangue, secreções, anestésico ou com alterações de temperatura inadequada para recepção do material fresco, também influenciam na motilidade dos espermatozoides (BARTH, 2000; PEREIRA et al., 2016).

O uso de anestésicos para imobilização dos reprodutores promove a diminuição no estresse e facilita o manejo na coleta de fluido seminal, mas em situações quando houver a contaminação de resíduos de água com anestésico no fluido seminal, é provável influenciar as taxas de motilidade espermática. A influência negativa do anestésico Eugenol® sobre a motilidade de tilápia do Nilo foi reportada por Pereira et al. (2016), sendo 91,0% a média de células moveis em peixes não anestesiados, comparado a 81,5% de média de motilidade espermática observada em peixes anestesiados para manejo. Esses mesmo autores não observaram influência da anestesia sobre o volume e tempo de motilidade.

A concentração espermática é outro parâmetro importante em avaliações andrológicas voltadas para reprodução e produção, conforme apontado por (VIVEIROS, GODINHO, 2009), uma vez que o número de espermatozoides em espécies de peixes nativos no Brasil apresentam altos índices de variação, e doses hormonais pequenas para estímulo seguidas de

dose indutoras mais elevadas podem promover maior volume seminal com redução da concentração espermática.

No presente estudo foram observados $12,68 \pm 2,65 \times 10^9$ espermatozoides/mL, valores dentro dos níveis relatados em outros estudos de $7,9 \times 10^9$ a 35×10^9 espermatozoides/mL ((MARIA et al., 2011; MENEZES et al., 2008) para o tambaqui.

As morfologias espermáticas foram classificadas como sugerido por Blom (1973), em defeitos maiores, quando decorrentes de falhas durante a espermatogênese, patologia testicular ou epididimária, que irão afetar a fertilidade, ou em defeitos menores, quando provenientes de alterações de forma de baixa relevância, que não interfere tanto na fertilidade.

As alterações na morfologia espermática, referentes aos principais defeitos menores ($5,50 \pm 1,77\%$), foram quantificadas em cabeça isolada normal (3,42%) e cauda enrolada na porção terminal (4,15%). As alterações morfológicas referentes aos defeitos maiores ($2,56 \pm 0,94\%$), mais frequentes foram gota proximal (2,14%) e cauda fortemente dobrada (3,14% dos espermatozoides).

Segundo Blom (1973), quanto menor o percentual de alterações morfológicas encontradas, melhor será o desempenho reprodutivo e a fertilidade do reprodutor.

Os valores das alterações totais foram inferiores no presente trabalho ($8,06 \pm 2,32\%$) quando comparados com valores mensurados em outros estudos: $68,12 \pm 1,72\%$ (GALO, 2013) e $15,04 \pm 0,86\%$ (MARIA et al., 2011). Embora não existam parâmetros específicos para peixes, o CBRA (2013) preconiza que animais com anormalidades espermáticas superiores a 30% (bovinos e equinos) e de 20% (ovinos e suínos), não sejam recomendados para procedimentos de inseminação artificial, podendo comprometer a fertilidade. O baixo percentual de alterações morfológicas observados nos reprodutores utilizados para o presente estudo demonstram que os reprodutores apresentavam ótimo estado de saúde e qualidade espermática, bem como a eficiência da equipe no manejo reprodutivo e a eficácia da técnica utilizada para preparar as amostras.

O método de coloração à base de eosina-nigrosina é outro procedimento recomendado para determinar se o ejaculado encontra-se viável para a reprodução, sendo os espermatozoides vivos (células viáveis, não coradas) ou mortos (células inviáveis, coradas em rosa). Esse parâmetro é baseado na possibilidade de haver falha na integridade da membrana espermática, o que facilita a passagem de íons para dentro da célula em casos de morte celular (BARTH, OKO, 1989; MARIA et al., 2011; CBRA, 2013).

Reprodutores com viabilidade espermática igual ou superior a 70% de células viáveis são considerados viáveis para a reprodução, conforme preconizado por MARIA et al. (2011) e

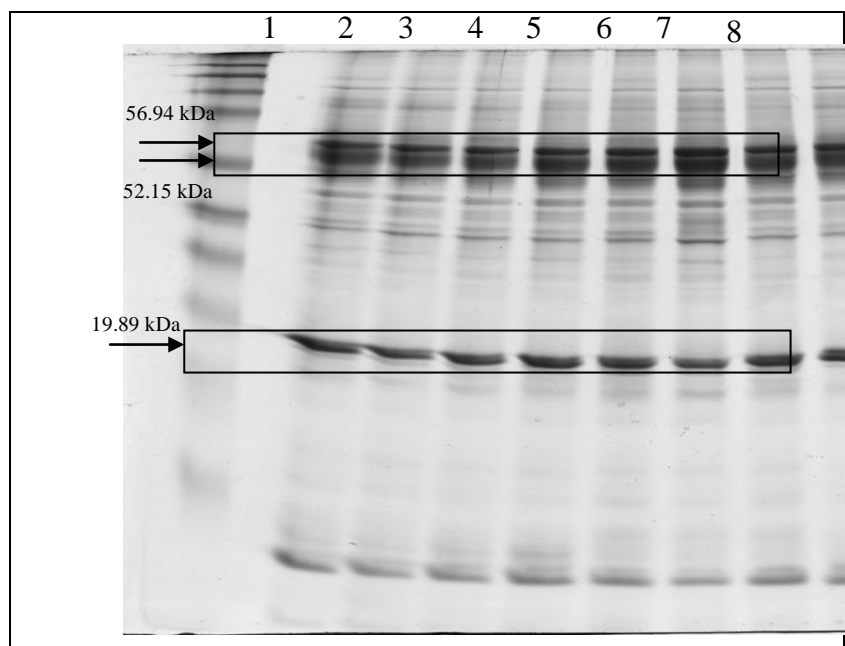
CBRA (2013). Neste estudo, todas as amostras apresentaram viabilidade espermática aceitável ($84,5 \pm 4,50\%$).

A viabilidade espermática nos reprodutores que receberam duas doses de EBH 0,25 e 2,50 mg /kg foi de 97,5% de células viáveis e os reprodutores não induzidos esses índice foi de 96,8%. Valores inferiores ($67,83 \pm 17,67\%$) de viabilidade espermática foram encontrados por Murgas et al. (2011) em reprodutores de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Essas informações indicam que o método de eosina-nigrosina adaptado tem potencial para uso na avaliação de sêmen de peixes.

O perfil eletroforético possibilitou a detecção de 26 bandas proteicas, sendo este estudo o primeiro a descrever essa diversidade de bandas proteicas em plasma seminal de tambaqui. Essa informação suscita a necessidade de estudos sobre a influência dessas proteínas na qualidade seminal da espécie.

Através da análise do gel unidimensional, ficaram evidenciadas com maior intensidade as bandas proteicas com pesos moleculares de 56,94 kDa, 52,15 kDa e 19,89 kDa, sendo que estas bandas foram observadas nas amostras seminais de todos os reprodutores (Fig. 1).

Figura 1 - Eletroforese unidimensional em gel poliacrilamida 12,5% (corado com Coomassie Brilliant Blue R-250) de plasma seminal de tambaqui. À esquerda da figura está o marcador molecular (Amersham ECL Rainbow Marker - Full Range) como referência de pesos variando de 12 a 225 kDa. As colunas à direita com as numerações (1 a 8) consistem nas bandas proteicas do plasma seminal de cada reprodutor. As setas indicam as bandas com picos de maior intensidade.



Fonte: Arquivo pessoal.

O gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) mostrou que houve diferença na composição do plasma seminal pela distribuição dos pesos das bandas proteicas entre os reprodutores amostrados, com pesos moleculares variando de 9,87 kDa a 221,93 kDa.

Ao avaliar o plasma seminal de truta arco-íris através da técnica de eletroforese unidimensional em gel poliacrilamida malha 15%, Asadpour et al. (2013) encontraram nove bandas proteicas com pesos moleculares variando de 68,12 kDa a 11,74 kDa. Sendo as bandas com peso molecular 68,12, 60,20 e 54,19 kDa, as encontradas em maior abundância, sendo esta última com peso molecular próximo aos encontrados em duas bandas para tambaqui (52,15 e 56,94 kDa) no presente estudo.

Apesar de os estudos com proteínas do plasma seminal de peixes nativos do Brasil ainda serem escassos, a associação entre a presença destas proteínas com a fertilidade de peixes já foi confirmada para truta arco-íris (LAHNSTEINER et al., 2004), carpa comum (KOWALSKI et al., 2003), tilápia (MOCHIDA et al., 2002) e tambaqui (GALO, 2013).

A associação da técnica de proteômica *shotgun* por eletroforese unidimensional e cromatografia líquida permitiu a identificação de 152 proteínas em trutas arco-íris (NYNCA et al. 2014) com predominância das proteínas transferrinas (75 kDa), apolipoproteínas A-II (16 kDa) e alpha-1-antiproteínases (48 kDa), e de 186 proteínas em carpa comum (DIETRICH et al. 2014), possibilitando a criação de um amplo banco de dados de proteínas. Bandas com proteínas com pesos moleculares 15,79 kDa e 47,32 kDa foram encontradas em 87,5% dos machos de tambaqui amostrados nesse estudo. Tais valores de peso molecular, se aproximados talvez possam corresponder às apolipoproteínas A-II e alpha-1-antiproteínases, desempenhando funções relacionadas ao recurso energético do sêmen, manutenção da membrana espermática, garantia da integridade de membrana, ação antioxidante, antimicrobiana e proteolítica.

A descoberta destas proteínas como principais componentes do plasma seminal sugere fortemente que a proteção espermática em peixes é exercida por estas proteínas de fase aguda (acute phase proteins - APPs) (CIERESZKO et al., 2017).

Estas proteínas são caracterizadas por serem multifuncionais, como por exemplo, a transferrina atua no transporte de ferro, na ação antioxidante, antimicrobiana e proteção contra íons de cádmio. As proteínas do grupo das apolipoproteínas, encontradas no plasma seminal da carpa, pode também estar relacionadas aos recursos da energia espermática e à manutenção da composição específica da membrana dos espermatozoides para garantir sua integridade de membrana (CIERESZKO et al., 2017).

Em peixes, proteínas com peso molecular inferior a 50 kDa foram associadas também com a qualidade espermática. Lahnsteiner et al. (2004) relataram que a adição de proteínas do plasma seminal (PPS) de peso molecular inferior a 50 kDa no meio diluidor, maiores taxas de motilidade espermática foram observadas para truta arco-íris. Fato semelhante relatado por Galo (2013) que associou as proteínas de 12, 25, 29, 34, 44 e 50 kDa com efeitos positivos com a motilidade progressiva em sêmen de tambaqui pós-descongelamento.

A identificação de 14 bandas proteicas por Campos et al. (2010) em sêmen de jundiá, possibilitou correlacionar que proteínas com pesos moleculares de 38,3 kDa encontradas nas amostras de 91,4% dos reprodutores que apresentaram motilidade espermática inferior a 80%. Proteínas com pesos moleculares inferiores a 50 kDa, variando entre 36,22 e 37,72 kDa, também foram detectadas no presente estudo, indicando haver relação com a motilidade e outros parâmetros espermáticos e processos fisiológicos reprodutivos.

Assim como podem ocorrer alterações nos parâmetros espermáticos de peixes em sistema de cultivo por decorrência da época do ano (GALO, 2013), repouso reprodutivo (LAHNSTEINER et al., 2004) ou manejo (BARTH, 2000), os perfis proteicos do plasma seminal dos peixes também sofrem ação direta de outros fatores (intrínsecos e extrínsecos), alterando sua composição proteica e sua função no metabolismo (CIERESZKO et al., 2017).

Os avanços da proteômica em plasma seminal de peixes, desde a detecção das bandas em associação com índices reprodutivos são importantes para a pesquisa e o setor produtivo, possibilitando avanços consistentes relacionados aos programas de melhoramento genético e manutenção de germoplasma de espécies aquícolas.

Estas proteínas poderão ser utilizadas como indicadores de qualidade seminal e de fertilidade, auxiliando em programas de biotecnologias aplicadas a reprodução e fertilidade nesta espécie. As descobertas do presente estudo são essenciais para criação de um banco de dados de proteínas do plasma seminal de peixes nativos neotropicais, que servirá de suporte na escolha de reprodutores aptos para a reprodução e garantia da sanidade animal, além de auxiliar nos programas de conservação e recuperação de espécies ameaças de extinção.

CONCLUSÃO

O plasma seminal de tambaqui expressa uma ampla diversidade de bandas proteicas, com maior expressividade em 19,9, 52,1 e 56,9 kDa, as quais após identificadas, poderão ser associadas com inúmeros fatores fisiológicos e bioquímicos relacionados à reprodução.

REFERÊNCIAS

- AQUINO-CORTEZ, A.; PINHEIRO, B. Q.; LIMA, D. B. C. et al. **Proteomic characterization of canine seminal plasma**. *Theriogenology*, v. 95, p.178-186. 2017.
- ASADPOUR, R.; TAYEFI –NASRABADI, H.; SHEIKHZADEH, N. **Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Seminal Plasma Proteins and their Correlation with Semen Characteristics**. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 41, p.1108. 2013.
- BARTH, A. D. **Bull Breeding Soundness Evaluation**. Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 75 p. 2000.
- BARTH, A. D. ; OKO, R. J. **Preparation of semen for morphological evaluation**. In: **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa State University Press, p.285, 1989.
- BLOM, E. **The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram**. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-339, 1973.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem*, v.72: p.248-54, 1976.
- BRANDÃO, F.R. et al. **Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanque-rede**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, p.357-362, 2004.
- CAMPOS, V. F.; SEIXAS, F. K.; KAEFER, C.; CAVALCANTI, P. V.; AMARAL, M. G.; THOMAZ LUCIA JR, T.; JOÃO CARLOS DESCHAMPS, J. C.; COLLARES, T. **Association between the presence of a 38 kda factor in the seminal plasma and inhibition of sperm motility in jundiá fish *rhamdia quelen***. *CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA*, V. 11, N. 2, 2010.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 49 p. 2013.
- CIERESZKO, A.; DIETRICH, M.A.; NYNCA, J. **Fish semen proteomics — New opportunities in fish reproductive research**. *Aquaculture*, v.472, p.81–92, 2017.
- DIETRICH, M.A., ARNOLD, G.J., FRÖLICH, T., CIERESZKO, A., 2014. **In-depth proteomic analysis of carp (*Cyprinus carpio L*) spermatozoa**. *Comp. Biochem. Physiol.DGenom.Proteom*, v.12, p.10–15, 2014.
- FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 pp. 2016.
- FERREIRA, A. A. NUÑER, A. P. O. ; LUZ, R. K. et al. **Avaliação qualitativa e quantitativa do semen de jundiá, *Rhamdia quelen***. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.
- GALO, J. M. **Avaliação da qualidade dos gametas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva**. Tese (doutorado em Zootecnia) –

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 89 f, 2013.

IBGE. Tabela 3940 – **Produção da aquicultura, por tipo de produto (notas)**. 2016. [HTTPS://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940](https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940). Acesso em 08/06/2017.

KOWALSKI, R.; GLOGOWSKI, J.; KUCHARCZYK, D. et al. **Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts**. *Journal of Fish Biology*, v.63, p.1008-1019, 2003.

KUBITZA, F. **Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos**. *Panorama da aquicultura*. v.12, n.82, p 27-39, 2004.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. **Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa**. *Theriogenology*, v.62, p.801-808, 2004.

MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; CARNEIRO, P.C.F. **Indução hormonal e características do sêmen tambaqui *Colossoma macropomum***. *Zygote*, v.1, pp. 1-5, 2011.

MENEZES, J.T.B.; QUEIROZ, L.J; DORIA, C.R.C. et al. **Avaliação espermática pósdescongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**. *Acta Amazonica*, v.38, p.365-368, 2008.

MOCHIDA, K.; MATSUBARA, T.; ANDOH, T. et al. **A novel seminal plasma glycoprotein of a teleost, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), contains a partial von willebrand factor type D domain and a zona pellucida-like domain**. *Molecular Reproduction and Development*, v.62, p.57-68, 2002.

MURGAS, L.D. S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R. et al. **Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.186-191, 2011.

NYNCA, J., ARNOLD, G.J., FRÖLICH, T. et al. **Proteomic identification of rainbow trout seminal plasma proteins**. *Proteomics*. v.14, p.133–140, 2014.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M., MARIA, A. N. et al. **Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri***. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.59: p.1509–1515, 2007.

PEREIRA, P. N. B.; SILVA, A. C.; TEIXEIRA3, E. G.; FARIAS, W. R. L. **Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. v.10, n.3, p. 415 – 435, 2016.

PINHEIRO, J. P. S.; LEITE-CASTRO, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; LOPES, J. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. **Qualidade do sêmen de tambaqui (*colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo**. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.17, n.2, p. 267-273, 2016.

RODRIGUEZ, M. **Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces**. Ed. A.G.T. 79 p., 1992.

STOSS J. **Fish gamete preservation and spermatozoan physiology**. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. *Fish physiology*, IX B. New York: Academic Press; p. 305e50, 1983.

VIEIRA, M.J.A.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. et al. **Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial**. *Arch. zootec.* vol.60 no.232 Córdoba dic. 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. **Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review**. *Fish Physiol Biochem.*; v.35(1): p.137-150, 2009.