

## ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS NOS ESPERMATOZÓIDES DO CURIMBATÁ, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881) (OSTEICHTHYES, CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE)

[Abnormal morphology of “curimbatá” *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae) spermatozoa]

Emico Tahira Kavamoto<sup>1,4</sup>, Valquíria Hippolito Barnabe<sup>2</sup>, Benedicto do Espírito Santo de Campos<sup>3</sup>, Elaine Fender de Andrade-Talmelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pesquisador Científico - Centro de Pesquisa em Reprodução e Larvicultura - Instituto de Pesca - SAA

<sup>2</sup> Profa. Dra. do Departamento de Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo, SP

<sup>3</sup> Pesquisador Científico - Instituto de Zootecnia - SAA - Nova Odessa, SP

<sup>4</sup> Endereço/Address: Av. Francisco Matarazzo, 455 - CEP 05001-900 - São Paulo, SP

### RESUMO

Para verificar a existência de anormalidades morfológicas nos espermatozóides de curimbatá (*Prochilodus scrofa*) antes e após duas aplicações de hCG, foram coletadas amostras de sêmen de 48 exemplares com 3 anos de idade. As 384 amostras obtidas foram examinadas utilizando-se microscópio de contraste de interferência diferencial, sendo 192 esfregaços corados pelo método de Williams e 192 preparações úmidas de sêmen fixadas em glutaraldeído a 0,2%. O exame da motilidade dos espermatozóides foi realizado sob microscopia de contraste de fase. A análise de variância mostrou correlação altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre a porcentagem de espermatozóides com anormalidades na cabeça e o tempo decorrido da aplicação hormonal. Quando foram considerados conjuntamente os defeitos morfológicos maiores e menores, a média total foi igual a 9,54%. A motilidade espermática apresentou valor médio de 94,17% e os tipos de anormalidades de maior incidência nos espermatozóides foram caudas dobradas ou enroladas e ausência de cauda.

**Palavras-chave:** curimbatá, *Prochilodus scrofa*, morfologia do espermatozóide, indução hormonal

### ABSTRACT

Semen was collected from 48 “curimbata” fish (*Prochilodus scrofa*), 3 years old, prior and post two i.m. injections of hCG, in order to verify possible abnormal morphology in spermatozoa. Under differential interference contrast microscopy, 384 samples of semen were examined, being 192 smears stained by Williams’s method and 192 wet preparations in 0.2% glutaraldehyde. Sperm motility was also evaluated under differential interference contrast microscopy. Statistical analyses showed high significant correlation ( $P < 0.01$ ) between sperm head abnormalities and time elapsed from hormonal treatment. The minor defects plus major ones resulted in 9.54% in average while sperm motility resulted in a mean value of 94.17%. Overall higher defects observed were bent tails and free sperm heads.

**Key words:** “curimbatá”, *Prochilodus scrofa*, spermatozoa morphology, hormonal induction

### Introdução

Os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes, até o presente momento, têm-se baseado em exames da motilidade, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides vivos e mortos (Kavamoto *et al.*, 1985), sem levar em consideração a ocorrência de defeitos morfológicos nas células espermáticas.

Ginzburg (1972) descreveu os espermatozóides de algumas espécies de peixes como sendo estruturas constituídas por cabeça com acrosso-

intermediária e cauda. Todavia, o mesmo autor constatou, por métodos citológicos, que os espermatozóides da maioria dos teleósteos não possuem acrosso-

mo. O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina. Assim, foram realizados estudos a fim de se evitar a expansão de doenças decorrentes de anormalidades espermáticas, responsáveis pelo baixo índice de fertilidade (Blom, 1973; Barth e

Oko, 1989).

Gwo, Kurokura e Hirano (1993) pesquisaram a capacidade de fertilização e a motilidade, associadas a mudanças morfológicas após o congelamento dos espermatozoides da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, da carpa, *Cyprinus carpio*, e do baiacu, *Fugu niphobles*.

Diante da escassez de informações sobre a ocorrência de anormalidades morfológicas nos espermatozoides de peixes autóctones e da grande contribuição que um estudo deste porte traria, decidiu-se realizar um experimento visando obter estas informações. Para tanto, foram utilizadas amostras de sêmen de exemplares de *Prochilodus scrofa* antes e após receberem duas aplicações hormonais com a finalidade de registrar a ocorrência de anormalidades e sua relação com as aplicações de hormônios e o tempo de ação.

## Material e Métodos

Para a análise morfológica dos espermatozoides, nos meses de novembro e dezembro de 1991 e janeiro de 1992, retiraram-se duas alíquotas de sêmen de 48 exemplares de curimatá, *P. scrofa*, com 3 anos de idade, criados no Núcleo de Aqüicultura de Pindamonhangaba do Instituto de Pesca - São Paulo.

Os reprodutores foram transportados dos tanques de criação para o laboratório e em seguida anestesiados com solução de clorobutanol a 3%, sendo marcados individualmente. Os 48 peixes foram divididos em grupos de 8 indivíduos, para cada tempo de ação hormonal. O sêmen de cada reprodutor foi colhido por compressão do abdômen no sentido ântero-posterior, antes e após 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas da primeira aplicação de hCG (gonadotropina coriônica humana) por via intramuscular, na dose de 5 UI/g. Decorridos 14 dias, colheu-se novamente o sêmen, antes da segunda aplicação hormonal e após 16 horas, completando-se 384 amostras. Todas estas amostras foram avaliadas quanto a motilidade dos espermatozoides misturando-se, sobre uma lâmina, uma gota de sêmen com gotas de solução de bicarbonato de sódio a 1%. As leituras foram realizadas em microscópio de contraste de fase, considerando a porcentagem de células espermáticas móveis no campo microscópico, utilizando a escala arbitrária de 0 a 100%, segundo Salisbury e Vandemark (1964).

Para o estudo da morfologia da cabeça dos espermatozoides, 192 esfregaços foram preparados

com uma gota de sêmen colocada sobre uma lâmina, adicionando-se uma gota maior de quimiotripsina e misturadas com o auxílio de outra lâmina. Estes esfregaços foram corados pelo método de Williams (1920), obedecendo à seguinte seqüência: álcool absoluto por 3 a 4 minutos; solução de cloramina (0,5%), por 1 a 2 minutos até a retirada do muco; lavagem em água destilada; lavagem em álcool 96° GL; coloração em carbol-fucsina-eosina por 6 a 7 minutos; lavagem em água destilada e, por fim, secagem em chapa quente.

Para a análise da morfologia dos espermatozoides, as amostras de sêmen foram colocadas, com o auxílio de tubo capilar em tubos de plástico munidos de tampas, medindo 5 cm de comprimento por 1,2 cm de diâmetro interno, previamente preenchidos com 2 ml de glutaraldeído a 0,2%, seguido de leve homogeneização. Este material foi transportado refrigerado, para o laboratório do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Posteriormente, foram realizadas 192 preparações úmidas de sêmen através da retirada de uma gota do material fixado, com auxílio de pipeta Pasteur, colocada entre lâmina e lamínula e, em seguida, vedada com esmalte para unhas. As leituras foram realizadas sob microscopia de contraste de interferência diferencial (aumento de 1.250x em objetiva de imersão), observando-se cerca de 200 espermatozoides de cada lâmina, tanto dos esfregaços como das preparações úmidas. O número de células normais e anormais foi expresso em porcentagem.

A partir dos dados obtidos, foram calculados os valores médios e seus respectivos desvios padrão.

A análise de variância da porcentagem de defeitos morfológicos foi realizada seguindo o modelo matemático (Snedecor e Cochran, 1980):

$$Y_{ijk} = m + h_i + d_{ij} + a_{ik} + (da)_{jk} + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

$Y_{ijk}$  = número de defeitos morfológicos.;

$m$  = média geral;

$h_i$  = efeito das horas de ação hormonal ( $i = 8, 16, 24, 48, 72, 96$  horas);

$d_{ij}$  = efeito das doses dentro das horas de ação hormonal ( $j = 1$  (uma) 2 -duas);

$a_{ik}$  = efeito das aplicações (antes e depois da 1ª e da 2ª dose ou seja,

$j = 1$ - antes e 2 - depois);

$(da)_{jk}$  = interação entre doses e aplicações hormonais;

$e_{ijk}$  = erro residual

**Tabela 1.** Valores médios do número de espermatozoides com anormalidades morfológicas na cabeça, peça intermediária e cauda observadas em 384 amostras de sêmen de curimatá, antes e após a ação hormonal, Pindamonhangaba, 1991/1992

Parâmetros	1ª dose							2ª dose	
	Antes	após						Antes	após
		8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	96 h		16 h
	$\bar{x} \pm s$								
A	2,02 ± 0,61	1,63 ± 0,52	1,31 ± 0,59	1,13 ± 0,69	1,50 ± 0,66	1,63 ± 0,44	2,25 ± 0,66	2,10 ± 0,52	2,36 ± 0,63
B	5,60 ± 1,07	5,50 ± 0,93	4,25 ± 1,49	4,75 ± 1,28	5,13 ± 1,25	5,63 ± 0,74	6,25 ± 0,89	5,92 ± 0,87	6,06 ± 1,23

A - Anormalidades da cabeça    B - Anormalidades da peça intermediária e cauda     $\bar{x} \pm s$  - média e desvio padrão

## Resultados

O valor médio da porcentagem de motilidade dos espermatozoides observada foi igual a 94,17% e o de espermatozoides com anormalidades na cabeça, peça intermediária e cauda, igual a 9,54%.

Os valores médios e respectivos desvios padrão do número de espermatozoides com defeitos morfológicos da cabeça, peça intermediária e cauda, observados nas 384 amostras de sêmen de *P. scrofa*, em diferentes tempos de ação hormonal, antes e após a primeira e a segunda dose de hCG, estão apresentados na Tabela 1.

O teste de Tukey foi aplicado para análise de contraste entre as médias, em níveis de 1 e 5% de probabilidade.

Com a aplicação da análise de variância observou-se que houve diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ), entre a porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos da cabeça, após a segunda dose de hCG, quando esta foi relacionada com a porcentagem observada após a primeira dose, para o fator tempo (24, 48 horas) e apenas diferença significativa ( $P < 0,05$ ), para 72 e 96 horas (Tabela 2). A interação entre as doses e aplicações hormonais foi altamente significativa ( $P < 0,01$ ), sendo superior antes da primeira dose hormonal, ocorrendo o inverso após a segunda. Com relação à análise dos dados obtidos 16 horas após a segunda aplicação hormonal, decor-

ridos 14 dias da primeira, foi possível observar que houve influência dos diferentes intervalos de tempo da primeira dose, no aparecimento de defeitos morfológicos nos espermatozoides.

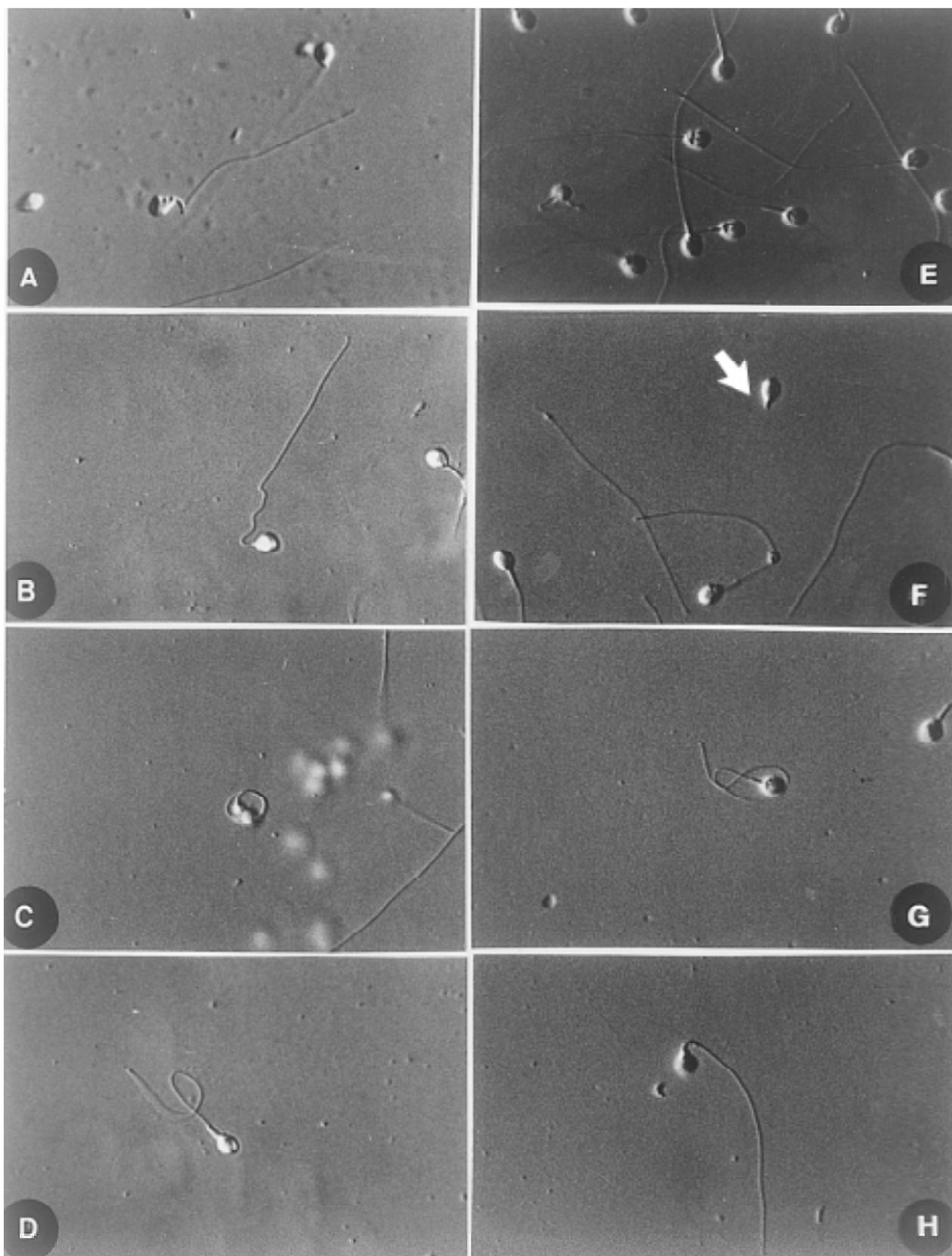
A Tabela 2 apresenta a análise de variância do número de espermatozoides com defeitos morfológicos na cabeça, observado nos esfregaços de sêmen coletados antes da primeira dose hormonal ( $A_1$ ); em diferentes tempos (8,16,24,48,72 e 96 horas) de ação hormonal após a primeira dose ( $D_1$ ); antes da segunda dose ( $A_2$ ) e 16 horas após a segunda dose ( $D_2$ ).

A Figura 1 apresenta os diferentes tipos de anormalidades morfológicas observadas nos espermatozoides, durante o experimento, utilizando-se a análise microscópica de contraste de interferência diferencial. Na Figura 1A observa-se defeito na cabeça (irregularidade da membrana) e na peça intermediária; a Figura 1B mostra a peça intermediária em forma de saca-rolha; a Figura 1C apresenta a peça intermediária e a cauda fortemente enroladas ao redor da cabeça; Figura 1D mostra a cauda fortemente dobrada; a Figura 1E evidencia defeito somente na cabeça; a Figura 1F mostra espermatozoide sem a cauda e outro com a cauda contendo gota citoplasmática; a Figura 1G mostra peça intermediária e cauda em forma de chave de sol e a Figura 1H evidencia o espermatozoide contendo peça intermediária em posição retro-axial.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância do número de espermatozoides com defeitos morfológicos da cabeça, em amostras de sêmen de *P. scrofa*, antes da primeira dose de hCG (Q.M.A<sub>1</sub>) e após a primeira dose (Q.M.D<sub>1</sub>), antes da segunda dose (Q.M.A<sub>2</sub>) e após a segunda dose (Q.M.D<sub>2</sub>)

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL.	Q.M.A <sub>1</sub>	Q.M.D <sub>1</sub>	Q.M.A <sub>2</sub>	Q.M.D <sub>2</sub>	Q.M.
REGRESSÃO LINEAR	1	52,41 **	20,82 **	32,21 **	13,48 **	43,13 **
REGRESSÃO QUADRÁTICA	1	7,51 *	8,47 **	0,94 **	2,46	5,32 **
REGRESSÃO CÚBICA	1	0,73	0,04	1,99 **	0,88	0,07
REGRESSÃO DE 4º GRAU	1	5,15 *	1,27	4,33	2,37	2,79
DESVIOS DE REGRESSÃO	1	0,18	1,10	0,21	0,19	0,03
RESÍDUO	173	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15

\*\* =  $P < 0,01$     \* =  $P < 0,05$     G.L. = Graus de Liberdade    Q.M. = Quadrado Médio



**Figura 1.** Microscopia de contraste de interferência diferencial, apresentando os defeitos morfológicos mais comuns nos espermatozoides de *Prochilodus scrofa* - Pindamonhangaba - 1991 e 1992 (1250 X). **A)** defeito na cabeça (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração na forma; **B)** peça intermediária em forma de saca-rolha; **C)** peça intermediária e cauda fortemente enroladas ao redor da cabeça; **D)** cauda fortemente dobrada; **E)** defeitos na cabeça; **F)** espermatozoide sem cauda (seta) e outro com a cauda contendo gota citoplasmática; **G)** peça intermediária e cauda em forma de chave de sol e **H)** peça intermediária em posição retro-axial

## Discussão

Trabalhos referentes às anormalidades dos espermatozoides de peixes autóctones são raros. A determinação destes defeitos poderá servir de parâmetro para alertar sobre fatores que possam provocar alterações na fertilidade, como foi discutido por Blom (1973) em bovinos, cuja classificação foi adotada neste estudo.

O espermatozoide do curimatá é constituído por cabeça sem acrossomo (Borges Filho, 1987), peça intermediária e cauda. Segundo Ginzburg (1972), os espermatozoides da maioria dos teleósteos não possuem acrossomo. A mesma constatação foi feita por Scott e Baynes (1980), em Salmonídeos, Nagahama (1983), em diversas espécies, e Romagosa *et al.* (1993) em *Piaractus mesopotamicus*. Quanto a forma da cabeça do espermatozoide, Alexandrino, Phan e Pinheiro (1985) descreveram que, em *Prochilodus scrofa*, a cabeça apresenta forma arredondada. De acordo com Billard (1970), Ginzburg (1972) e Grier (1985), a forma da cabeça dos espermatozoides está relacionada com o tipo de fertilização realizada pela espécie, afirmando existir relação entre cabeça arredondada e fertilização externa e entre alongadas e fertilização interna.

No presente estudo, a leitura realizada em esfregaços de sêmen ou em preparações úmidas mostrou 9,54% de espermatozoides com defeitos morfológicos na cabeça, peça intermediária e cauda, quando considerados os defeitos morfológicos maiores e menores em conjunto. Segundo Blom (1973), em bovinos a porcentagem de anormalidades espermáticas chega a 15%, sendo, portanto, mais elevada do que aquela obtida neste estudo. Associando-se a reduzida porcentagem de defeitos nas células espermáticas a 94,17% de motilidade, pode-se presumir a ocorrência de elevada taxa de fertilização.

Na primeira colheita, observou-se a presença de maior número de células espermáticas apresentando cabeça maior e cauda mais curta. Este fato pode ter possivelmente ocorrido porque, no momento da colheita, estas células possivelmente encontravam-se em fase de transição de espermátide para espermatozoide. Já, após o tratamento hormonal observou-se que a cabeça e cauda dos espermatozoides apresentavam tamanhos mais homogêneos, estando ausentes aqueles de cabeça maior e cauda curta.

A constatação da elevação do número de espermatozoides com anormalidades na cabeça, peça intermediária e cauda com o aumento no tempo após a aplicação hormonal, quando não ocorre a elimina-

ção do sêmen, provavelmente está ligado ao processo de degeneração deste tipo celular. De acordo com as pesquisas realizadas por Lahnsteiner, Patzner e Weismann (1993), em truta arco-íris e Lahnsteiner, Patzner e Weismann (1994), em ciprinídeos, durante o período reprodutivo alguns espermatozoides são reabsorvidos pelo epitélio do ducto espermático. Durante este processo os espermatozoides são envolvidos por microvilos e transportados para o interior das células dentro de vacúolos heterofágicos, onde sofrem lise e se transformam em corpos lamelares constituídos de fosfolípidos.

O processo de absorção celular também foi observado em fêmeas de várias espécies de peixes, que não eliminam seus ovócitos no momento ideal após a indução hormonal. Estas fêmeas, quando chegam a eliminar seus óvulos, apresentam baixa taxa de fertilização ou, ainda, não ocorre a fertilização dos gametas. Quando os ovócitos ficam retidos nos ovários, são denominados de “over ripe” por Lam (1985) e entrarão em processo de degeneração e posterior absorção.

Billard, Dupon e Barnabe (1977) mostraram que o sêmen não apresenta características constantes durante todo o período de espermição, sendo sua qualidade afetada pelo processo de envelhecimento das células, que se apresenta mais intenso no período posterior ao “pico” de reprodução (Billard e Takashima, 1983).

As anormalidades morfológicas da peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de fertilização. Entre os defeitos observados, os mais comuns foram cauda dobrada e/ou enrolada e ausência de cauda.

## Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1 - Houve aumento do número de espermatozoides com anormalidades com o aumento no número de horas de ação hormonal;

2 - As taxas de anormalidades morfológicas das células espermáticas observadas, encontram-se abaixo dos limites considerados normais para os mamíferos, fornecendo indícios de que com sua utilização pode-se obter elevada taxa de fertilização.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração técnica de

Miguel Tadeu Lino de Freitas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

### Referências Bibliográficas

- ALEXANDRINO, A.C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E.F.G. 1985 Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá *Prochilodus scrofa*, (Steindachner, 1881) durante o ciclo reprodutivo. *Bolm. Zool. Univ. S.Paulo*, 9:159-75.
- BARTH, A. D. & OKO, R.J. 1989 *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, Iowa State University Press, 285 p.
- BILLARD, R. 1970 Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons Téléostéens. -In: BACCETTI, B., ed. *Comparative spermatology*. New York, Academic Press. p. 71-9.
- BILLARD, R.; DUPON, J.; BARNABE, G. 1977 Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (poisson téléostéen) pendant la période de spermiation. *Aquaculture*, Amsterdam, 11(4):363-7.
- BILLARD, R. & TAKASHIMA, F. 1983 Resorption of spermatozoa in the sperm duct of rainbow trout during the post-spawning period. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 39(3):387-392.
- BLOM, E. 1973 Ultrastrukturen af nogle spermiedefekter af for slag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermogram. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, 25(7-8):383-91.
- BORGES FILHO, O.F. 1987 *Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultraestruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo de Prochilodus scrofa Steindachner, 1881*. São Paulo, Universidade de São Paulo. 234 p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP).
- GINZBURG, A.S. 1972 *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Springfield, Department of Commerce, National AM Technical Information Service, p. 87-359.
- GWO, J.C.; KUROKURA, H.; HIRANO, R. 1993 Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp and marine puffer. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 59(5): 777-82.
- GRIER, H.J. 1985 Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-57.
- KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; RIGOLINO, M. G.; CARVALHO FILHO, A. C. 1985 Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 12(3):73-81.
- LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. 1993 The spermatid ducts of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion. *J. Fish Biol.*, 42 (1): 79-93.
- LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A.; WEISMANN, T. 1994 Testicular main ducts and spermatid ducts in some Cypinid fishes. I. Morphology, fine structure and histochemistry. *J. Fish Biol.*, 44 (3): 459 - 67.
- LAM, T.J. 1985 Applications of endocrinology to fish culture. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 39: 11-137.
- NAGAHAMA, Y. 1983 The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W.S.; RANDAL, D.J. *Fish physiology*. New York, Academic Press, v.9 p. 233-275.
- ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. de; BRAGA, F. M. S. 1993 Mudanças morfológicas dos testículos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), em condições de confinamento. *Revista UNIMAR*, 15: 1-17.
- SALISBURY, G. M. & VANDEMARK, N. L. 1964 *Fisiología de la reproducción y de la inseminación artificial de los bóvidos*. Zaragoza, Acribia, 707 p.
- SCOTT, A. P. & BAYNES, S. M. 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17: 707 - 39.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. 1980 *Métodos estatísticos*. México Continental, 7 ed., 703p.
- WILLIAMS, W. W. 1920 Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Vet.*, 10: 87 - 94.