

DOSE INSEMINANTE E EMBRIOGÊNESE NA FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA DE CARPA COMUM NO NORDESTE BRASILEIRO

(Inseminating dose and embryogenesis in assisted fertilization of common carp in northeastern of Brazil)

Francisco Renan Aragão LINHARES*; Jordana Sampaio LEITE; Yasmim Maia FERREIRA; Priscila Silva de ALMEIDA-MONTEIRO; Rômulo Roberto Ribeiro PINHEIRO; Assis Rubens MONTENEGRO; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY

Universidade Estadual do Ceará (UECE), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil.
CEP: 60.741-000. E-mail: renan.aragao@hotmail.com

RESUMO

A presente pesquisa visou determinar a dose inseminante para a fertilização assistida da carpa comum, e o registro em imagens e o tempo de desenvolvimento de cada fase embrionária desta espécie em latitude equatorial. Verificou-se que a porcentagem de fertilização aumentou de forma linear, atingindo um platô em 45,5% na proporção de 208.295 espermatozoides/oócito. Assim, recomenda-se o uso da dose inseminante de aproximadamente 200.000 espermatozoides/oócito na rotina de fertilização assistida dessa espécie, no nordeste brasileiro. Além disso, o desenvolvimento embrionário da carpa em latitude equatorial segue a cronologia semelhante ao relatado para a espécie em clima temperado.

Palavras-chave: *Cyprinus carpio*, embriologia, espermatozoides/oócito, reprodução.

ABSTRACT

The present research aimed at determining insemination dose for artificial fertilization of common carp, and record images and time in the development of each embryonic stage of the species in equatorial latitude. The fertilization rate increased linearly up to the proportion of 208.295 spermatozoa/oocyte, and, from this point, the fertilization rate was maintained at 45.5%. Therefore, we recommend the use of the insemination dose of approximately 200.000 sperm/oocyte in the artificial fertilization routine of common carpin brazilian northeast. Moreover, embryonic development of carp in equatorial latitude follows the chronology similar to that reported for the species in temperate zones.

Keywords: *Cyprinus carpio*, embryology, spermatozoa/oocyte, reproduction.

INTRODUÇÃO

A carpa comum foi introduzida no Nordeste do Brasil, por meio do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) no ano de 1977 (DNOCS, 2009), e nos últimos anos representa o quarto pescado da aquicultura continental mais produzido no país (BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA, 2011). De acordo com

*Endereço para correspondência:
renan.aragao@hotmail.com

o mesmo boletim, o Nordeste representa a segunda maior produção aquícola continental de pescado entre as regiões nacionais.

Nesse contexto, biotecnias aplicadas à fertilização assistida em peixes surgem como ferramentas essenciais para auxiliar a crescente demanda de pescado no Brasil. A biotecnica de fertilização assistida consiste em fertilizar o maior número de oócitos com a menor quantidade de espermatozoides, garantindo a máxima fertilidade com maior economia de sêmen (LEITE *et al.*, 2013). Porém, apesar da fertilização assistida de carpa comum ser dominada (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014), ainda são utilizados diferentes volumes de sêmen por oócito (dose inseminante), surgindo uma dúvida sobre a escolha da dose mais eficiente para a realização da técnica.

Para avaliar o sucesso da fertilização assistida, torna-se necessário o acompanhamento do desenvolvimento embrionário, visando a obtenção de embriões viáveis. Apesar de existir relatos sobre o desenvolvimento embrionário da espécie em regiões de clima temperado (NICA *et al.*, 2012), o registro de imagens e a cronologia deste desenvolvimento para carpa comum em latitude equatorial no Nordeste do Brasil não são relatados na literatura. A compreensão desses eventos embrionários auxiliará na produção de novas linhagens de carpa comum no Nordeste do Brasil.

Dessa forma, os objetivos da presente pesquisa foram a determinação da dose inseminante, ou a proporção de espermatozoide/oócito adequada para uso na fertilização assistida de carpa comum e o registro de imagens e do tempo de desenvolvimento de cada fase embrionária para esta espécie em condições naturais, na latitude equatorial do nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE; 11516665-3/63). O experimento foi realizado nos meses de dezembro de 2014 e janeiro de 2015, no Centro de Pesquisas em Aquicultura (CPAq) do DNOCS em Pentecoste - Ceará, situado a 3° 45' 00" de latitude sul e 39° 10' 24" de longitude oeste.

O experimento foi dividido em duas etapas: (1) determinar a dose inseminante, ou seja, a melhor proporção do número de espermatozoides por oócitos; (2) registrar imagens e acompanhar a cronologia do desenvolvimento embrionário. Para a etapa 1, o sêmen foi obtido de 5 machos sexualmente maduros (43,5±2,13cm; 1,9±0,6kg), que receberam dose única de extrato hipofisário de carpa (EHC; Danúbio Aquicultura Ltda., Brasil) de 1mg/kg de peso vivo. Doze horas após a indução hormonal da reprodução, foi formado um pool do sêmen coletado por meio de massagem abdominal.

O volume seminal foi aferido por meio de tubos graduados, o pH por fitas de pH (MERCK-Alemanha) e a concentração espermática por contagem em câmara de Neubauer. A análise subjetiva da motilidade (0 a 100%) foi estimada com o auxílio de um microscópio ótico (Nikon Eclipse E200 - ampliação de 100x), após a adição de 100µL da água do tanque a 2µL de sêmen. Os oócitos foram obtidos de duas fêmeas sexualmente maduras (53±8,49cm; 4,15±0,92kg) submetidas à indução da desova pela aplicação de

duas doses de EHC (0,5 e 5,0mg/kg, com intervalo de doze horas entre elas). Após a aplicação da segunda dose hormonal, a temperatura da água do tanque foi verificada a cada hora, para determinar o momento da desova (tempo de latência) em horas-grau.

Foi formado um pool de ova do qual foram retiradas três amostras de 1g para estimar a concentração de oócitos. Do mesmo pool de ova, também foram retiradas 5 amostras de 25g, que foram fertilizadas com 20 μ L, 80 μ L, 237,5 μ L, 315 μ L ou 395 μ L do pool de sêmen em quintuplicata. Essas quantidades de sêmen corresponderam às seguintes doses inseminantes: 15.152 (D1), 60.491 (D2), 179.584 (D3), 238.072 (D4) e 298.563 (D5) espermatozoides/oócito. Em seguida, utilizou-se o protocolo preconizado por Billard *et al.* (1995), para a desagregação dos ovos. Estes logo foram transferidos para incubadoras cônicas de fluxo constante com capacidade para 20L.

Para a segunda etapa experimental, exemplares de embriões foram observados em microscópio ótico (ampliação de 40x), equipado com uma câmera fotográfica digital. A taxa de fertilização foi calculada por meio da contagem de embriões em estágio de gástrula dividido pelo total de oócitos. A taxa de eclosão foi estimada quando pelo menos 50% das larvas eclodiram, contando-se o número de larvas e dividindo-se pelo número total de ovos fertilizados. Foram observados aleatoriamente 200 embriões de cada incubadora para ambos os parâmetros avaliados.

Simultaneamente ao experimento, foram analisados temperatura, oxigênio dissolvido (Phtek, modelo DO-100) e pH (KASVI, modelo K39-0014P) da água das incubadoras de três em três horas, desde o início da fertilização assistida, até as fases finais do desenvolvimento embrionário. Também foram analisados os parâmetros de alcalinidade, de dureza, de amônia e de nitrito conforme recomendações do Guia da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental e analisadas pela Superintendência Estadual do Meio Ambiente do Ceará. A etapa 2 da pesquisa também foi realizada em quintuplicata, obedecendo as mesmas condições experimentais.

Para as análises estatísticas, os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para a confirmação dos requerimentos e para a realização da análise de variância (distribuição normal dos resíduos e homocedasticidade, respectivamente). A análise de variância foi então executada, considerando um delineamento inteiramente casualizado, no qual o efeito da quantidade de espermatozoides por oócito foi avaliado. Nos casos em que houve significância do efeito, foi aplicado o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para a comparação das médias. Aplicou-se o modelo de regressão segmentada ou descontínua (Modelo BrokenLine ou Linear Response Plateau), por meio do procedimento NLIN do programa SAS (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de pH e volume seminais e de concentração e motilidade espermáticas registrados foram 7,33 \pm 0,29, 9,19 \pm 2,84mL, 26,6 \pm 2,55 $\times 10^9$ espermatozoides mL⁻¹ e 95%, respectivamente. A quantidade mínima e máxima de ova liberada foi de 111 e 638g, respectivamente, com uma concentração média de 1408 \pm 146,5 oócitos por grama de ova. As fêmeas desovaram após 196,75 \pm 8,13 horas-grau do final do tratamento hormonal,

correspondendo a um tempo de latência de 7 horas. Todos esses valores foram semelhantes aos parâmetros observados na literatura para carpa comum (IRAWAN *et al.*, 2010).

No que diz respeito à etapa 1, foi verificado que as taxas de fertilização aumentaram gradativamente, até a proporção de 208.295 espermatozoides/oócito (Tab. 01). Quando a proporção foi aumentada para 238.072 e 298.563 espermatozoides/oócito, a porcentagem de oócitos fertilizados permaneceu constante.

Tabela 01: Taxa de fertilização e eclosão (%) de ovos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) fertilizados com diferentes proporções de espermatozoides (sptzs) por oócito.

Dose insemicante	Proporção sptzs/oócito	Taxa de fertilização (%)	Taxa de eclosão (%)
D1	15,152	13,50±2,09 ^a	83,80±13,34
D2	60,491	22,50±4,91 ^b	65,00±15,05
D3	179,548	40,50±2,12 ^c	83,25±10,68
D4	238,072	45,80±7,12 ^c	70,80±12,75
D5	298,563	46,60±3,49 ^c	71,40±9,13

Letras minúsculas sobscritas distintas representam diferenças significativas entre linhas.

Obteve-se a equação de regressão descontínua: $\hat{Y}=11,7559+0,000162X$ ($p<0,0001$), em que corresponde \hat{Y} =taxa de fertilização e X =espermatozoides por oócito, alcançando-se um alto grau de correlação entre as variáveis ($R^2=93,30$). A taxa de fertilização aumentou de forma linear até atingir a taxa máxima de 45,5%, e permaneceu constante, iniciando o platô na proporção de 208.295 espermatozoides/oócitos (Fig. 01). Esse ponto de início do platô representa a proporção mínima necessária para que a máxima fertilidade seja atingida.

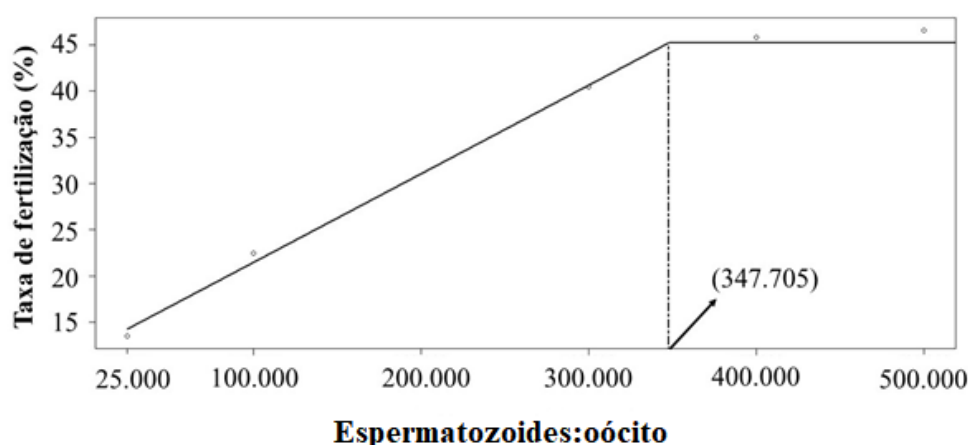


Figura 01: Taxas de fertilização assistida de oócitos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) fertilizados artificialmente, com diferentes relações espermatozoides/oócito.

Obs. Para $x < 208.295$, $y = 1,6 \cdot 10^{-4} + 11,7559$. Para $x > 208.295$, $y = 45,49$ ($R^2 = 93,30$). Modelo Broken Line ou Linear Response Plateau.

Apesar das taxas de fertilização terem apresentado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre si, os resultados referentes às taxas de eclosão não diferiram significativamente ($p < 0,136$) para as doses inseminantes utilizadas no presente estudo (Tab. 01).

A literatura relata a utilização de diferentes doses inseminantes utilizando sêmen fresco de ciprinídeos, obtendo resultados variados de taxa de fertilização e eclosão (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014). Essa variação entre os resultados se deve à utilização de diferentes protocolos de fertilização assistida, influenciando as taxas de fertilização e eclosão. O volume de solução acrescentada durante a mistura dos gametas é um exemplo disso. Segundo BILLARD *et al.* (1995), se um baixo volume de água for usado para um grande número de espermatozoides por oócito, a baixa qualidade do sêmen pode ser mascarada pela grande quantidade de espermatozoides, afetando a confiabilidade dos resultados.

Outro ponto ligado a variação do protocolo de fertilização assistida é a quantidade excessiva de espermatozoides durante o ajuste da proporção espermatozoides/oócito. O aumento dessa proporção pode ocasionar acúmulo de espermatozoides na micrópila, gerando poliespermia e/ou competição entre os espermatozoides (KWANTONG e BART, 2009). A razão ótima de espermatozoides/oócito verificadas no presente estudo foi de 208.295. No entanto, o aumento da proporção de espermatozoides/oócito para 298.563 manteve-se no platô de fertilização (45,5%), não sendo observado o efeito do excesso de espermatozoides de carpa comum, sobre as taxas de fertilização.

Além dos fatores nutricionais, sociais, idade, fisiologia, manejo, estresse e etc., a qualidade da água também pode influenciar na qualidade dos gametas, interferindo nos resultados das doses inseminantes (VALDEBENITO, 2013). Apesar disso, a variação da temperatura da água (26 a 29,4 °C) durante o experimento não prejudicou as taxas de eclosão encontradas no presente estudo, não atingindo temperaturas iguais ou acima de 30 °C. De fato, segundo SAPKALE *et al.* (2011), só há diminuição da taxa de eclosão quando há um aumento da temperatura de 26 para 30 °C. Além disso, os teores de oxigênio dissolvido na água (6,10 a 8,61mg L⁻¹ O₂), alcalinidade (160 a 166mg L⁻¹ de CaCO₃), concentração de amônia (0,19 a 0,82mg L⁻¹) e nitrito (0,018 e 0,107mg L⁻¹) se mantiveram dentro da faixa recomendada por ARANA (1997), BORYSHPOLETS *et al.* (2009), LUKOWICZ (1982) e TAVARES (1995), respectivamente. Apesar dos valores encontrados para a dureza (273,6 a 284mg L⁻¹ de CaCO₃) se apresentarem acima dos parâmetros admissíveis (30 a 100mg L⁻¹ de CaCO₃), o pH médio (7,5) não oscilou, mantendo-se dentro do aceitável (SAPKALE *et al.*, 2011).

No que diz respeito à segunda etapa experimental, observou-se que as imagens geradas durante o acompanhamento do desenvolvimento embrionário se enquadraram no padrão de clivagem meroblástica discoidal, típica de ovos telolécitos (LEITE *et al.*, 2013).

Pode-se observar que a formação da blástula foi evidenciada com uma média de 3 horas após a fertilização (~82,61 horas-grau) (Fig. 2D). Nessa fase observou-se um abaulamento do polo animal. A fase de gástrula foi verificada entre 5 horas e 5 horas e 30

minutos após a fertilização (137,3 e 151,86 horas-grau) (Fig. 2E). Essa fase foi caracterizada pela movimentação de células do polo animal para o polo vegetal, recobrando gradativamente a região vitelínica. Conforme as células se movimentavam, a fase de gástrula avançou para as fases de 50%, 80% e 90% de recobrimento do vitelo, culminando com o fechamento do blastóporo. Esta última fase ocorreu em até 8 horas após a fertilização (~220,28 horas-grau) (Figs. 2F, 2G, 2H e 2I).

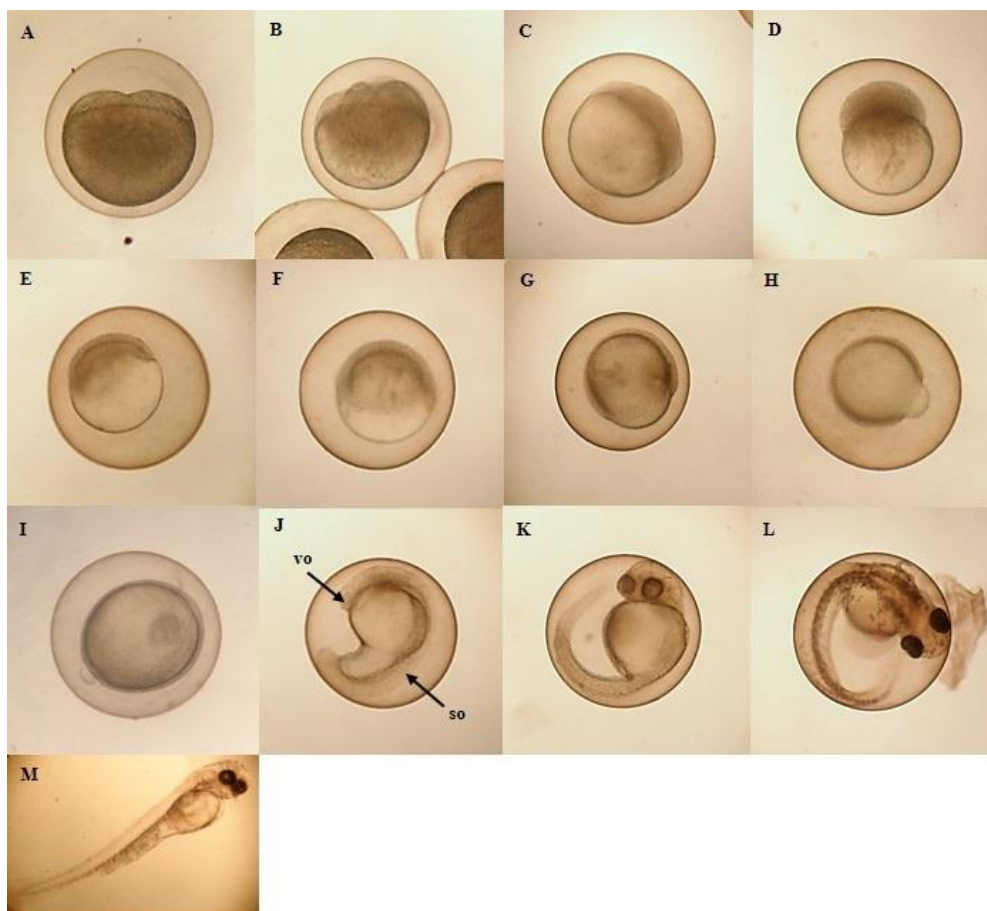


Figura 02: Estágios do desenvolvimento embrionário de carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Obs.: Primeiras segmentações (A e B), formação de mórula (C), formação de blástula (D), gástrula inicial (E), 50% de gastrulação (F), 80% de gastrulação (G), 90% de gastrulação (H), fechamento do blastóporo (I), diferenciação do embrião da vesícula ótica (vo) e formação dos somitos (so) (J), região caudal destacada do vitelo (K), embrião com movimentação dentro da membrana coriônica (L), eclosão (M). Aumento de 40x.

A diferenciação do embrião para um formato larval se deu entre 14 e 16 horas após a fertilização (384,44 e 441,76 horas-grau), tornando-se notório o aparecimento dos somitos e o início da encefalização, com o surgimento da vesícula ótica (Fig. 2J). O início do desprendimento da cauda do vitelo ocorreu entre 22 e 25 horas após a fertilização (604,12 e 690,25 horas-grau) (Fig. 2K). Nessa fase, foram observados os movimentos de contração muscular, tornando-se mais intensos com o avanço do desenvolvimento embrionário. O embrião apresentou movimento de natação dentro da membrana de fertilização, entre 40 e 43 horas após a fertilização (1104,4 e 1180,78 horas-grau) (Fig.

2L), até o momento em que a larva eclodiu e tornou-se livre. Mesmo antes da eclosão, já era possível visualizar o aparecimento de pigmentação ao longo do embrião e o início da circulação sanguínea, evidenciada pelos batimentos do coração. A eclosão das larvas ocorreu entre 42 horas e 30 minutos e 45 horas após a fertilização (1165,14 e 1235,7 horas-grau) (Fig. 2M).

Os tempos dos registros embrionários e eclosões dependem principalmente da temperatura da água de incubação dos embriões (SAPKALE *et al.*, 2011). Porém, observou-se que o tempo para se atingir o estágio de fechamento do blastóporo (220,28 horas-grau após a fertilização) e da eclosão (1165,14 e 1235,7 horas-grau após a fertilização) a uma temperatura média de 27,5 °C no presente estudo foi próximo ao relatado por NICA *et al.* (2012), para ciprinídeos em regiões temperadas (231 horas-grau; 1100 horas-grau, respectivamente, a 22 °C).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, recomenda-se o uso da dose inseminante de aproximadamente 208.295 espermatozoides/oócito, para a fertilização assistida dessa espécie no nordeste brasileiro. Além disso, o desenvolvimento embrionário da carpa, em latitude equatorial no Nordeste do Brasil, segue o padrão para ovos telolécitos, tendo cronologia semelhante ao relatado para a espécie em clima temperado.

REFERÊNCIAS

- ARANA, L. V. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. UFSC, 1997. 166p.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, v.129, p.95-112, 1995.
- BORYSHPOLETS, S.; DZYUBA, B.; RODINA, M.; LI, P.; HULAK, M.; GELA, D.; LINHART, O. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology*, v.59, p.291-296, 2009.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA AS SECAS. Relatório 2008. Fortaleza, 2009. Acesso em: 09 fev. 2015. Online. Disponível em: http://www.dnocs.gov.br/php/CGU/dnocs_relatorio_anual_2008.pdf.
- IRAWAN, H.; VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.236-243, 2010.
- KWANTONG, S.; BART, A.N. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). *Aquaculture Research*, v.40, p.292-297, 2009.

LEITE, L.V.; MELO, M.A.P.; OLIVEIRA, F.C.E.; PINHEIRO, J.P.S.; CAMPELLO, C.C.; NUNES, J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, n.2, p.421-429, 2013.

LUKOWICZ, M.V. Intensive carp *Cyprinus carpio* (L.) is rearing in a farm pond in southern Germany and its effects on water quality. Aquaculture Engineers, v.1, n.2, p.121-137, 1982.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 2011. Acesso: em 09 fev. 2015. Online. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol_bra.pdf.

NICA, A.; CRISTEA, V.; GHEORGHE, D.; HOHA, G.V.; ENACHE, I.B. Embryonic and larval development of japanese ornamental carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, v.58, p.116-120, 2012.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; LINHARES, F.R.A.; CARVALHO, M.A.M.; OLIVEIRA, M.S.; NUNES, J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de ciprinídeos. Acta Veterinaria Brasileira, v.8, supl.2, p.292-298, 2014.

SAPKALE, P.H.; SINGH, R.K.; DESAI, A.S. Optimal water temperature and pH for development of eggs and growth of spawn of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Applied Animal Research, v.39, n.4, p.339-345, 2011.

TAVARES, L.H.S. Limnologia aplicada a aquicultura. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 70p.

VALDEBENITO, I.I. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. Zygote, v.23, p.177-197, 2013.