

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

CARLOS FREDERICO CECCON LANES

**Caracterização, criopreservação e manipulação genética do sêmen do linguado
Paralichthys orbignyanus (Teleostei: Paralichthyidae)**

RIO GRANDE, RS

2008

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Caracterização, criopreservação e manipulação genética do sêmen do linguado

Paralichthys orbignyanus (Teleostei: Paralichthyidae)

CARLOS FREDERICO CECCON LANES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Rio Grande – RS

Fevereiro de 2008

Sumário

Agradecimentos	vi
Resumo geral	vii
Abstract	ix
Introdução Geral.....	1
Bibliografia	4
Capítulo I.....	8
Avaliação da qualidade do sêmen do linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> ao longo da estação reprodutiva	8
Resumo	10
Abstract.....	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	17
Bibliografia	21
Capítulo II	33
Criopreservação do sêmen do linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i>	33
Resumo	35
Abstract.....	37
1. Introdução	39
2. Material e Métodos.....	40
3. Resultados	44
4. Discussão	45
Agradecimentos.....	47
Bibliografia	47
Capítulo III	56
Avaliação da atividade da enzima DNase no plasma seminal e incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides do linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i>.....	56
Resumo	58
Abstract.....	59
1. Introdução	60
2. Material e Métodos.....	61
3. Resultados	65
4. Discussão	67
Agradecimentos.....	70
Bibliografia	70
Discussão geral	84
Bibliografia	86
Conclusões gerais.....	88

Dedico esta dissertação aos meus pais.

Agradecimentos

Aos meus pais por todo o esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado por tudo. Vocês são demais.

Aos meus irmãos (Dário, Leonardo e Gustavo), avós e tios por estarem sempre junto comigo e me dando muita força para chegar até aqui.

Ao Luf por ter me orientado por mais dois anos e sempre ter me ajudado a superar as dificuldades da pesquisa.

Ao Sampaio por ter me co-orientado e sempre estar disponível para me ajudar e auxiliar nas horas que precisei.

Ao professor Deschamps e o professor Robaldo por terem colaborado e auxiliado na criopreservação do sêmen, assim como, por terem participado da banca e pelas sugestões feitas.

Ao Tiago, Paulo e Vinícius por também terem me ajudado na criopreservação do sêmen. Ao Marcelo Okamoto por ter me ajudado a realizar os testes de fertilização e sempre estar disponível para me ajudar a coletar o sêmen dos linguados. À Camila e a Indianara por me ajudarem a dosar a osmolalidade e a concentração dos íons.

Ao professor Adalto Bianchini por ter me ajudado a dosar a concentração dos íons do plasma seminal.

A todos os colegas e amigos da EMA que por muitas vezes me ajudaram a coletar o sêmen e pelos momentos divertidos que passamos durante as aulas e a realização dos experimentos.

À Maria Luisa por ter me ajudado muito na tradução dos trabalhos para o inglês.

A todos os colegas e amigos do laboratório de biologia molecular pelos momentos divertidos que passamos juntos e por sempre estarem disponível a colaborar na realização dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Aqüicultura por todo o aprendizado nas mais diferentes disciplinas.

Em especial a Ariane minha grande companheira, amiga e namorada por ter me ajudado muito e sempre estar do meu lado independente do que tivesse acontecendo.

A todos muito OBRIGADO!!!!

Resumo geral

O linguado *Paralichthys orbignyanus* é um importante recurso pesqueiro do oceano Atlântico Sul e é considerado uma espécie com grande potencial para a aqüicultura. A qualidade do sêmen é uma importante variável no manejo reprodutivo de espécies cultivadas, influenciando diretamente na produção de ovos viáveis. Além disso, o conhecimento das características físicas e químicas do sêmen é um importante fator no desenvolvimento de protocolos de resfriamento e criopreservação do sêmen. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o sêmen de *P. orbignyanus* ao longo da estação reprodutiva e utilizar essas informações para auxiliar no processo de criopreservação do sêmen e no desenvolvimento de um protocolo de transferência de genes mediada por espermatozóides (TGME). Na primeira etapa deste estudo, amostras de sêmen de linguados selvagens foram coletadas ao longo da estação reprodutiva. Através dos resultados obtidos foi verificado que a produção de espermatozóides e a motilidade progressiva aumentam significativamente à medida que a estação reprodutiva progride para o seu final ($P < 0.05$). A motilidade progressiva dos espermatozóides durou em média 10 min, porém o tempo total de motilidade alcançou cerca de 100 min. Com relação ao pH, a osmolalidade e a concentração dos íons K^+ , Cl^- e Mg^{2+} dosados no plasma seminal, assim como, para o percentual de células móveis, nenhuma diferença foi verificada ao longo da estação reprodutiva. No meio da estação foi observada uma diminuição na concentração do íon Ca^{2+} , a qual coincidiu com o menor tempo de motilidade dos espermatozóides. A concentração de Na^+ foi aumentando ao longo dos períodos monitorados, atingindo a maior concentração no fim da estação reprodutiva ($P < 0,05$). Na segunda parte deste estudo, a criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyanus* foi realizada. Para isso, foram testadas duas soluções crioprotetoras: uma contendo glicerol diluído numa solução a base de sais e outra contendo DMSO (dimetilsulfóxido) diluído numa solução à base de sacarose. Os dados de fertilização, eclosão e viabilidade larval demonstraram que as duas soluções utilizadas são eficientes na criopreservação do sêmen do linguado. Na última etapa deste estudo, alguns fatores limitantes na TGME em peixes foram avaliados e um protocolo de incorporação de DNA exógeno pelos espermatozóides foi desenvolvido. Os resultados obtidos nesta parte do trabalho demonstraram que o plasma seminal do *P. orbignyanus* apresenta uma forte atividade da enzima DNase. Entretanto, a atividade dessa enzima pode ser

eliminada ou diminuída lavando o sêmen com soluções contendo EDTA. Além disso, foi verificado que uma quantidade de DNA exógeno similar ou inferior a 50 ng/10⁶ espermatozóides deve ser usada na TGME em peixes. Por último, foi demonstrado que os espermatozóides do linguado *P. orbignyanus* são capazes de incorporar o DNA exógeno espontaneamente após a eliminação da atividade das DNases. Isto ficou evidente através da amplificação do DNA exógeno através de PCR. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar no manejo reprodutivo dessa espécie e, conseqüentemente, na implementação de programas de melhoramento genético tanto da forma clássica através da criopreservação do sêmen dos reprodutores que apresentam as melhores características fenotípicas, como através de técnicas modernas como a TGME.

Palavras-chave: *Paralichthys orbignyanus*; Caracterização do sêmen; Criopreservação; TGME;

Abstract

The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* is an important fishing resource from southern Atlantic coast of America and it has been considered for aquaculture. The sperm quality is an important variable in reproductive management of cultured species, influencing directly on the production of viable eggs. Moreover, the adequate knowledge of physical and chemical characteristics of the sperm is an important factor for developing short-term storage and cryopreservation protocols of sperm. The aim of this study was to characterize the *P. orbignyanus* sperm throughout the reproductive season to facilitate the sperm cryopreservation and to help in development of a sperm mediated gene transfer (SMGT) protocol. In the first part of this study, sperm samples were collected from wild flounders throughout the reproductive season. It was verified that the sperm production and the progressive motility of spermatozoa increased significantly towards the end of reproductive season ($P < 0.05$). The mean time of progressive motility of spermatozoa was 10 min, however the total time of motility reached about 100 min. No difference was observed during the reproductive season in pH, osmolality and concentrations of K^+ , Cl^- e Mg^+ measured in seminal plasma as well as in percentage of cells motility. In the middle of the breeding season was observed a reduction in Ca^{+2} concentration which has coincided with the lesser motility time of spermatozoa. The Na^+ concentration increased throughout the season, reaching the highest concentration at the end of reproductive period ($P < 0.05$). In the second part of this study, the cryopreservation of the flounder sperm was carried out. Two different cryosolutions were tested: glycerol – saline and DMSO - sucrose. The results of fertilization, hatching rate and larval viability demonstrate that both solutions are efficient in the cryopreservation of the flounder sperm. In the last part of this study, some limitant factors for exogenous DNA uptake by spermatozoa were evaluated and a SMGT protocol was developed. It was observed a strong DNase activity in *P. orbignyanus* seminal plasma. However, it was verified that DNase activity can be eliminated or decreased washing the sperm with EDTA-containing solutions. Moreover, it was verified that an amount of exogenous DNA similar or inferior to 50 ng/10⁶ cells should be used in fish SMGT. At last, it was demonstrated that fish spermatozoa are capable to uptake exogenous DNA spontaneously after DNase activity elimination. This was evidenced through exogenous DNA amplification by PCR. The results of the

present study should help in reproductive management of this species and consequently in implementation of genetic improvement programs based not only in the sperm cryopreservation, but also using modern techniques such as SMGT.

Key words: *Paralichthys orbignyanus*; Sperm characterization; Cryopreservation; SMGT;

Introdução Geral

O cultivo de linguados é uma realidade em várias regiões do mundo, especialmente na Europa e na Ásia onde o “turbot” (*Psetta maxima*) e o “hirame” (*Paralichthys olivaceus*) são, respectivamente, as espécies de maior produção. Na Europa o cultivo do “turbot” atingiu 6.700 toneladas e movimentou cerca de 52 milhões de dólares no ano de 2005. Na Ásia o cultivo do “hirame” chegou a 44.000 toneladas e movimentou cerca de 419 milhões de dólares (FAO, 2005).

Para o continente americano, estatísticas sobre a produção de linguados oriunda da aqüicultura são incipientes (FAO, 2005). Entretanto, várias espécies de *Paralichthys* vêm sendo avaliadas para a sua introdução na piscicultura. Dentre elas encontram-se: *P. lethostigma* e *P. dentatus* nos Estados Unidos (Lee & Ostrowski, 2001), *P. tropicus* na Venezuela (Rosas *et al.*, 1999), *P. woolmani* no Equador (Guartatanga, 1997), *P. microps* e *P. adspersus* no Chile (Alvial & Manriquez, 1999) e *P. patagonicus* e *P. orbygnianus* na Argentina (Bambill *et al.*, 2000; Bambill *et al.*, 2006).

No Brasil, diversas espécies de linguado distribuem-se ao longo da costa, sendo que as espécies mais abundantes no sul do país são *P. patagonicus* e o *P. orbygnianus*. *Paralichthys patagonicus* ocorre em alto mar, em profundidades superiores a 30 m, já *P. orbygnianus* possui uma distribuição costeira e estuarina, habitando águas com profundidades inferiores a 20 m (Figueiredo, 2000). Essa característica é importante, pois permite a captura de reprodutores junto a águas rasas, facilitando a sobrevivência dos animais em cativeiro (Sampaio *et al.*, 2006). Dados referentes à pesca demonstram que a captura de linguados ao longo da costa brasileira está estagnada desde 2003, não ultrapassando as 3.000 toneladas por ano, sendo que para o estado do Rio Grande do Sul a captura vem diminuindo durante esse período (IBAMA, 2005).

Vários estudos com o linguado *P. orbigyanus* têm demonstrado que essa espécie possui um grande potencial para ser utilizada na aqüicultura, pois, além de possuir um alto valor comercial, possui boa tolerância aos fatores ambientais (Sampaio & Bianchini, 2002), tais como salinidade (Wasielesky *et al.* 1995), temperatura (Wasielesky *et al.*, 1998), compostos nitrogenados (Bianchini *et al.*, 1996) e estresse ácido (Wasielesky *et al.*, 1997). Além disso, já se obteve bons resultados com relação ao processo de reprodução induzida em laboratório (Cerqueira *et al.*, 1997; Robaldo, 2003, Bambill *et al.*, 2006).

O uso de gametas de boa qualidade é importante para a produção de larvas viáveis, entretanto a avaliação dos gametas é um processo difícil de ser realizado (Kjorsvik *et al.*, 1990). As técnicas usadas para medir a qualidade do sêmen em peixes incluem: monitorar a concentração de espermatozóides, avaliar o espermatócrito, medir a osmolalidade, o pH e a composição de íons do plasma seminal, atividade enzimática, concentração de ATP (adenosina trifosfato), motilidade, morfologia e a capacidade de fertilização dos espermatozóides (Rurangwa *et al.*, 2004). Estudos sobre as características do sêmen também são necessários para entender os processos bioquímicos básicos que ocorrem na motilidade dos espermatozóides, assim como durante a fertilização (Alavi & Cosson, 2006). Esses estudos tornam-se ainda mais necessários para estabelecer protocolos adequados de conservação e criopreservação do sêmen (Piros *et al.*, 2002).

As pesquisas realizadas na área da criopreservação de gametas e embriões de organismos aquáticos têm avançado muito pouco quando comparada às realizadas com animais e plantas terrestres. Essa ferramenta tem sido empregada com sucesso na criopreservação do sêmen de peixes e invertebrados aquáticos, porém, a sua utilização em nível de cultivo, ainda, é muito limitada (Chao & Liao, 2001).

A criopreservação do sêmen é um método eficiente para armazenar células viáveis por longos períodos, podendo fornecer ao longo do ano um suplemento de gametas masculinos (Zhang *et al.*, 2003). É considerada como uma ferramenta essencial para proteger espécies que estão ameaçadas de extinção, facilitando o armazenamento de seus gametas em bancos genéticos. Além disso, permite a sincronização da disponibilidade de gametas, melhor aproveitamento do volume de sêmen disponível (espécies em que o sêmen é difícil de ser obtido ou que liberam pouca quantidade), redução de custos relativos à manutenção do plantel de reprodutores machos, facilita o transporte de gametas (quando os gametas são obtidos de diferentes locais), permite a utilização dos gametas de melhor qualidade durante a época reprodutiva, permite o estabelecimento de programas de melhoramento genético e pode ser um instrumento facilitador na transferência de genes (Suquet *et al.*, 2000; Chao & Liao, 2001).

A transferência de genes (transgênese), nas últimas duas décadas, tem sido empregada com sucesso, em nível experimental, no melhoramento genético de espécies utilizadas na aquicultura (Maclean, 2003). Os resultados obtidos utilizando essa

ferramenta têm sido promissores, principalmente, no aumento das taxas de crescimento, na maior eficiência na conversão alimentar e na maior resistência a doenças (Devlin *et al.*, 1994; Dunham *et al.*, 2002; Maclean *et al.*, 2002; Sarmasik *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2007). Além dessas características, peixes geneticamente modificados também têm sido produzidos, com o objetivo de aumentar a resistência ao congelamento, reduzir a dieta alimentar a base de proteína animal, produzir peixes estéreis e usar peixes transgênicos como bioreatores para a produção de fármacos (Maclean, 2003; Rasmussen & Morrissey, 2007).

Atualmente, existe uma série de técnicas disponíveis para produzir peixes transgênicos, tais como: microinjeção em ovos recém fertilizados (Ozato *et al.*, 1986), eletroporação de ovos e sêmen (Inoue *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 2002), lipofecção em tecidos gonadais (Lu *et al.*, 2002), uso de vetores retrovirais (Lin *et al.*, 1994) e biobalística (Yazawa *et al.*, 2005). Destas, a microinjeção é a técnica que tem sido mais utilizada e aplicada com sucesso na produção de peixes transgênicos. Entretanto, a microinjeção é uma técnica trabalhosa e limitada por certas características dos ovos de determinadas espécies (ovos pequenos, córion rígido, pouca transparência, etc.) (Hostetler *et al.*, 2003). Além disso, essa técnica produz, quase invariavelmente, indivíduos mosaicos. O mosaicismismo ocorre quando o transgene integra-se em apenas uma parcela de células ou tecidos no embrião, dificultando a transmissão para a descendência no caso de não haver integração nos tecidos gonadais (Maclean, 1998). Em espécies marinhas como o linguado *P. orbignyianus* que produzem ovos pequenos, em grande quantidade e que possuem acesso fácil aos gametas masculinos, uma alternativa seria a transferência gênica mediada por espermatozóides. O uso de espermatozóides como vetores de DNA exógeno possibilita a realização de transgênese em massa, diminuindo a probabilidade da produção de mosaicos e facilitando a obtenção de linhagens germinativas já na primeira geração (Spadaphora *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o sêmen do linguado *P. orbignyianus* e utilizar essas informações para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação do sêmen e um de manipulação genética para a incorporação de DNA exógeno pelos espermatozóides. Para atingir esses objetivos, no primeiro capítulo o sêmen foi caracterizado física e quimicamente ao longo da estação reprodutiva. No segundo capítulo, duas soluções crioprotetoras foram avaliadas para o desenvolvimento do

protocolo de criopreservação. No terceiro capítulo, foram avaliados os processos que limitam a interação dos espermatozóides com o DNA exógeno para a manipulação genética do sêmen.

Bibliografia

- ALAVI, S.M.H., & J. COSSON. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biol. Int.*, 30: 1-14.
- ALVIAL, A. & J. MANRÍQUEZ. 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture*, 176: 65-73.
- BAMBILL, G.A., F.A.R. PÉREZ, M.I. MÜLLER, A.V. LÓPEZ, E.O. ARISTIZÁBAL, M. RADONIC, A.G. VEGA. 2000. Larvicultura del lenguado argentine *Paralichthys patagonicus*. IV Jornadas de Ciencias del Mar, 11–15 septiembre 2000, Puerto Madryn, Argentina: 36.
- BAMBILL, G.A., M. OKA, M. RADONIC, A.V. LÓPEZ, M.I. MÜLLER, J.J. BOCCANFUSO & F.A. BIANCA. 2006. Broodstock management and induced spawning of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) under a closed recirculated system. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 41: 45-55.
- BIANCHINI, A., Jr.W. WASIELESKY & K.C. MIRANDA. 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 453– 459.
- CERQUEIRA, V.R., R. MIOSO, J.A.G. MACCHIAVELLO & A.M. BRUGGER. 1997. Ensaio de indução de desova do linguado, *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839. *Bol. Inst. Pesca*, 24: 247–254.
- CHAO, N-H. & I.C. LIAO. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197:161–189.
- DEVLIN, R.H., T.Y. YESAKI, C.A. BIAGL, E.M. DONALDSON, P. SWANSON & W.K. CHAN. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- DUNHAM, R.A., G.W. WARR, A. NICHOLS, P.L. DUNCAN, B. ARGUE, D. MIDDLETON & H. KUCUKTAS. 2002. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol.*, 4: 338-344.

- FAO. 2005. Global Aquaculture Production 1950-2005. Fisheries global information system. <http://www.fao.org/>.
- FIGUEIREDO, J.L. & N.A MENEZES. 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. *Museu de zoologia / USP*. São Paulo. 116p.
- FIGUEIREDO, M.A., C.F.C. LANES, D.V. ALMEIDA, M.C. PROIETTI & L.F. MARINS. 2007. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem Physiol. D*, 2: 228-233.
- GUARTATANGA, R.I. 1997. Manual sobre la reproducción y larvicultura del lenguado: *Paralichthys woolmani*. *Fundación CENAIM-ESPL/JICA*. Guayaquil, Ecuador. 31p.
- HOSTETLER, H.A., S.L. PECK & W.M. MUIR. 2003. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Res.*, 12: 413–424.
- IBAMA. 2005. Estatística 2003-2005. <http://www.ibama.gov.br/>.
- INOUE, K., S. YAMASHITA, J-I. HATA, S. KABENO, S. ASADA & E. NAGAHISA. 1990. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Diff. Dev.*, 29: 123–128.
- KJORSVIK, E., A. MANGOR-JENSEN & I. HOLMEFJORD. 1990. Egg quality in fishes. In: Blaxter, J.H.S., Southward, A.J. (Eds.). *Adv. Mar. Biol.*, 26: 71-113.
- LEE, C.S. & A.C. OSTROWSKI. 2001. Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture*, 200: 89-109.
- LIN, S., N. GAIANO, P. CULP, J.C. BURNS, T. FRIEDMANN & J.K. YEE. 1994. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 265: 666–669.
- LU, J.K., B.H. FU, J.L. WU, & T.T. CHEN. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.*, 4: 328-337.
- MACLEAN, N. 1998. Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutat. Res.*, 399: 255–266.
- MACLEAN, N., M.A. RAHMAN, F. SOHM, G. HWANG, A. IYENGAR, H. AYAD & A. SMITH. 2002. Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene*, 295: 265-277.

- MACLEAN, N. 2003. Genetically modified fish and their effects on food quality and human health and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14: 242–252.
- OZATO, K., H. KONDOH, H. INOHARA, T. IWAMATSU, Y. WAKAMATSU & T.S. OKADA, 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differen.*, **19**: 237-244.
- PIROS B., J. GLOGOWSKI, R. KOLMAN, A. RZEMIENIECKI, J. DOMAGALA & A. HORVATH. 2002. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and starlet, *Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 289-295.
- RASMUSSEN, R.S. & M.T. MORRISSEY. 2007. Aquaculture: Transgenics and Polyploidy. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6: 2-16.
- ROBALDO, R.B. 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (VALENCIENNES, 1839) no ambiente e em cativeiro. *Tese de doutorado, FURG*. Rio Grande – RS, 200p.
- ROSAS, J., D. ARANA, T. CABRERA, J. MILLAN & D. JORY. 1999. The potential use of the Caribbean flounder *Paralichthys tropicus* as an aquaculture species. *Aquaculture*, 176: 51-54.
- RURANGWA, E., D.E. KIME, F. OLLEVIER & J.P. NASH. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1-28.
- SAMPAIO, L.A. & A. BIANCHINI. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269: 187–196.
- SAMPAIO, L.A., A. BIANCHINI & R.B. ROBALDO. 2006. Reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* em laboratório: desova induzida e natural. *Panorama da Aqüicultura*, 16: 52-55.
- SARMASIK, A., G. WARR & T.T. CHEN. 2002. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.*, 4 (3): 310-322.
- SPADAPHORA, C., I. SCIAMANNA, & C. PITTOGGI. 2005. Transferência gênica mediada por espermatozoides. In: T. Collares (ed.), *Animais Transgênicos: princípios e métodos*. Suprema, São Carlos, 167-189p.

- SUQUET, M., C. DREANNO, C. FAUVEL, J. COSSON & R. BILLARD. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Res.*, 31: 231-243.
- WASIELESKY Jr.W., K. MIRANDA & A. BIANCHINI. 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 38: 385–395.
- WASIELESKY Jr.W., A. BIANCHINI, M.H.S. SANTOS & L.H. POERSCH. 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquacult. Soc.*, 28: 202-204.
- WASIELESKY, W.J., A. BIANCHINI & F.K. MIRANDA. 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de linguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Maritimo* 17, 43-48.
- YAZAWA, R., I. HIRONO, E. YAMAMOTO & T. AOKI. 2005. Gene transfer for Japanese flounder fertilized eggs by particle gun bombardment. *Fisheries Science*, 71: 869–874.
- ZHANG, Y.Z., S.C. ZHANG, X.Z. LIU, Y.Y. XUA, C.L. WANG, M.S. SAWANT, J. LID, & S.L. CHEN. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60: 989–996.

Capítulo I

Avaliação da qualidade do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* ao longo da estação reprodutiva

Co-autores: Marcelo Okamoto, Adalto Bianchini, Luis Fernando Marins e Luís André Sampaio

Segundo normas da revista "Journal of Fish Biology"

Avaliação da qualidade do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* ao longo da estação reprodutiva

C. F. C. Lanes†, M. Okamoto‡, A. Bianchini†, L. F. Marins† e L. A. Sampaio‡*

†Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

‡Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: L.A. Sampaio. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia, Av. Itália, Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande – RS, Brasil. Tel.: +55 53 3236 8131; Fax: +55 53 3236 8042. E-mail: sampaio@mikrus.com.br

Resumo

O linguado *Paralichthys orbignyanus* é um importante recurso pesqueiro do oceano Atlântico Sul e nos últimos anos vem sendo considerado para aquicultura. A qualidade do sêmen é uma importante variável no manejo reprodutivo de espécies cultivadas, podendo influenciar diretamente no sucesso da fertilização e, conseqüentemente, na produção de ovos viáveis. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do sêmen do linguado *P. orbignyanus* ao longo da estação reprodutiva. As coletas de sêmen foram realizadas no início (outubro), meio (janeiro) e fim (abril) da estação reprodutiva. Os parâmetros analisados foram: volume de sêmen, concentração de espermatozóides, produção de espermatozóides, espermatócrito, osmolalidade, pH e composição iônica do plasma seminal, assim como, parâmetros relacionados a motilidade do sêmen. Durante o meio e o fim da estação reprodutiva foram obtidos os maiores volumes de sêmen ($P < 0,05$). A maior concentração de espermatozóides ($12,7 \pm 0,92 \times 10^9$ células ml^{-1}) foi verificada no início do período reprodutivo ($P < 0,05$). A produção de espermatozóides e a motilidade progressiva aumentaram à medida que a estação reprodutiva avançou para o seu final ($P < 0,05$). A motilidade progressiva dos espermatozóides durou em média 10 min, porém o tempo total de motilidade alcançou cerca de 100 min. Uma relação positiva foi encontrada entre espermatócrito e densidade de espermatozóides ($n=29$, R^2 ajustado = 0,67, $P < 0,0001$). No meio da estação reprodutiva foi observada uma diminuição na concentração do íon Ca^{2+} ($12,31 \pm 3,08$ mmol l^{-1}) e coincidiu com o menor tempo de motilidade dos espermatozóides (96 ± 5 min). Com relação ao percentual de células móveis, pH, osmolalidade e a concentração dos íons K^+ , Cl^- e Mg^+ nenhuma diferença foi observada ao longo da estação reprodutiva. A concentração do íon Na^+ foi aumentando ao longo dos períodos monitorados, atingindo a maior concentração ($174,62 \pm 12,68$ mmol l^{-1}) no final da estação reprodutiva ($P < 0,05$). As informações obtidas nesse estudo devem auxiliar no manejo reprodutivo dessa espécie e, conseqüentemente, facilitar o processo de seleção dos reprodutores a serem utilizados para a fertilização de desovas. Além disso, deve auxiliar no desenvolvimento de protocolos de resfriamento e criopreservação do sêmen.

Palavras-chave: Reprodução; *Paralichthys orbignyanus*; Espermatozóides; Qualidade do sêmen

Abstract

The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* is an important fishing resource from southern Atlantic coast of America and in the last years it has been considered for aquaculture. The sperm quality is an important variable in reproductive management of cultured species, influencing directly in the fertilization success and consequently in the production of viable eggs. The aim of this study was to evaluate the sperm quality of Brazilian flounder throughout the reproductive season. Sperm collection was carried out during the beginning (October), middle (January) and end (April) of reproductive period. Sperm volume, spermatozoa concentration, spermatozoa production, spermatocrit, osmolality and pH of seminal plasma, chemical composition of seminal plasma, as well as sperm motility parameters were investigated. During the middle and end of season it was observed the highest semen volumes ($P<0.05$). The highest spermatozoa concentration ($12.7\pm 0.92 \times 10^9$ cells ml^{-1}) was observed in the beginning of reproductive season ($P<0.05$). The spermatozoa production and the progressive motility have increased towards the end of reproductive season ($P<0.05$). In general terms, the mean time of progressive motility of spermatozoa was 10 min, however the total time of motility reached about 100 min along the reproductive period. A positive correlation was verified between spermatocrit and sperm concentration ($n=29$, adjusted $r^2 = 0.67$, $P<0.0001$). In the middle of the breeding season it was observed a reduction in concentration of Ca^{+2} ion (12.31 ± 3.08 mmol l^{-1}) and coincided with the lesser motility time of spermatozoa (96 ± 5 min). No difference was observed during the reproductive season in percentage of cells motility, pH, osmolality and concentrations of K^+ , Cl^- e Mg^+ ions measured in seminal plasma. The concentration of Na^+ ion increased throughout the season, reaching the higher concentration (174.62 ± 12.68 mmol l^{-1}) at the end of monitoring period ($P<0.05$). The information reported in this study could help the reproductive management and optimize the selecting process for high quality male donors for aquaculture operations for this specie, as well as, in development of short-term storage and cryopreservation protocols of sperm.

Key words: Reproduction; *Paralichthys orbignyanus*; Spermatozoa; Sperm quality

INTRODUÇÃO

O linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes) distribui-se desde o litoral do Estado do Rio de Janeiro (Brasil) até Mar del Plata (Argentina) (Figueiredo & Menezes, 2000), constituindo um importante recurso pesqueiro nessas áreas. Devido à alta demanda, o elevado preço comercial e a qualidade de sua carne o interesse no cultivo dessa espécie vem aumentando a cada ano. Estudos relacionados à fisiologia (Bianchini *et al.*, 1996, Wasielesky *et al.*, 1998; Sampaio & Biachini, 2002), reprodução (Cerqueira *et al.*, 1997, Radonic *et al.*, 2007), embriologia (Cerqueira, 2005) e a larvicultura (Sampaio *et al.*, 2007) tem auxiliado no desenvolvimento do seu cultivo.

O primeiro trabalho realizado com as células germinativas do linguado *P. orbignyanus* foi desenvolvido por Silveira *et al.* (1995), os quais classificaram o processo de espermatogênese em cinco fases e o da ovulogênese em seis fases. Além disso, observaram que o período reprodutivo dessa espécie estende-se da primavera (outubro) até o início do outono (abril). A partir disso, os estudos relacionados aos processos reprodutivos dessa espécie envolveram apenas o domínio das técnicas de reprodução para a obtenção de desovas naturais e induzidas em cativeiro (Cerqueira *et al.*, 1997; Radonic *et al.*, 2007). Dessa forma, pouco se conhece sobre as características físicas e químicas do sêmen do linguado *P. orbignyanus*.

O conhecimento adequado das características físicas e químicas do sêmen é importante para determinar a viabilidade reprodutiva dos peixes (Cieresko *et al.*, 2000). Além disso, é o ponto chave para otimizar os protocolos de fertilização e auxiliar no desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao resfriamento e a criopreservação de sêmen, assim como, na produção de animais transgênicos (Chao & Liao, 2001; Zohar & Mylonas, 2001).

Os parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade do sêmen em peixes incluem monitorar o volume de sêmen produzido, a concentração de espermatozoides, espermátocrito, osmolalidade, pH e composição de íons do plasma seminal, atividade enzimática, concentração de ATP (adenosina trifosfato), motilidade, morfologia e a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Rurangwa *et al.*, 2004). Dentre esses parâmetros, a estimativa do percentual de células móveis e o tempo de motilidade são considerados os mais importantes, pois estão diretamente relacionados com a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Alavi & Cosson, 2005).

Mudanças nos parâmetros relacionados à qualidade do sêmen de peixes ocorrem naturalmente durante a estação reprodutiva como tem sido mostrado para o “ocean pout” *Macrozoarces americanus* (Bloch & Schneider), o “red porgy” *Pagrus pagrus* (L.), o “Atlantic halibut” *Hippoglossus hippoglossus* (L.), o “Senegalese sole” *Solea senegalensis* (Kaup) e a “spiny eel” *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender) (Wang & Crim, 1997; Mylonas *et al.*, 2003; Babiak *et al.*, 2006; Cabrita *et al.*, 2006, Sahinöz *et al.*, 2007). Entretanto, as variações observadas não seguem o mesmo padrão entre as espécies. Assim, as mudanças que ocorrem na produção de sêmen ao longo da estação reprodutiva parecem ser espécie-específica. Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do sêmen do linguado *P. orbignyanus* ao longo da estação reprodutiva.

MATERIAL E MÉTODOS

PEIXES

Os linguados foram capturados na praia do Cassino (Brasil, 32° 12' S – 52° 10' O) durante a estação reprodutiva (outubro-2006 a abril-2007) e encaminhados para a Estação Marinha de Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os animais (306±24 g; 30±1 cm, média ± erro padrão) foram mantidos, por no máximo três dias antes da coleta do sêmen, em tanques circulares contendo 1000 l de água salgada, com aeração constante. Cerca de 100% do volume de água foi renovado diariamente. A variação da salinidade e da temperatura durante o período que os animais foram coletados podem ser visualizados na Figura 1. A coleta dos dados relacionados à temperatura e a salinidade foram feitos no início da manhã. O fotoperíodo foi mantido em 14 horas claro e 10 horas escuro.

COLETA DO SÊMEN

As amostras de sêmen foram coletadas durante os meses de outubro ($n=13$), janeiro ($n=8$) e abril ($n=15$) representando o início, meio e o fim da estação reprodutiva, respectivamente. Para a coleta do sêmen os linguados foram anestesiados com benzocaína (50 ppm). Durante a coleta, foram tomados cuidados para evitar a contaminação do sêmen com urina, sangue e fezes. Em seguida, o abdômen foi seco e

limpo com papel toalha. O sêmen foi coletado utilizando seringas descartáveis graduadas sem agulha (1 ml) através de extrusão manual e imediatamente transferido para microtubos de 1,5 ml.

AValiação DA MOTILIDADE DO SÊMEN

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi ativado com água salgada (35‰ \approx 1050 mOsmol kg⁻¹) através de uma diluição 1:50 (1 μ l de sêmen e 49 μ l de água salgada). A motilidade dos espermatozóides foi estimada em microscópio óptico sob o aumento de 400 \times usando uma escala arbitrária, na qual 0 representa 0%, 1 \equiv 1-25%, 2 \equiv 26-50%, 3 \equiv 51-75%, 4 \equiv 76-90% e 5 \equiv 91-100% de espermatozóides móveis (Borges *et al.*, 2005).

Além do percentual de células móveis foi estimado o tempo em que as células permaneciam em movimento progressivo e apenas vibrando. O tempo total de motilidade foi determinado quando não havia mais células em movimento. Os experimentos foram realizados em triplicata e a temperatura da sala foi mantida em 20 °C. Para diminuir o grau de variação, todos os experimentos foram realizados pelo mesmo observador.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SÊMEN

O volume de sêmen ejaculado foi medido diretamente nas seringas descartáveis graduadas. A concentração de espermatozóides foi determinada usando uma câmara de Neubauer espelhada (0,00025 mm³/quadrado). O sêmen foi fixado em formalina 4% e diluído em água destilada (1:2000). Para cada amostra foram realizadas duas diluições. A média desses dois valores foi utilizada para calcular a concentração real de células de cada amostra. Antes da contagem as amostras foram deixadas por cerca de 10 minutos na câmara de Neubauer para o assentamento das células e, posteriormente, as contagens foram realizadas usando um microscópio sob aumento de 400 \times .

A determinação do espermatócrito foi feita com sêmen não diluído. Tubos capilares de microhematócrito (75 mm de comprimento e 1,1 a 1,2 mm de diâmetro) foram preenchidos (\approx 70 %) com sêmen, sendo um lado do capilar lacrado com massa de modelar. Os capilares foram centrifugados numa centrífuga de microhematócrito na velocidade de 12000 \times g por 40 min.

A produção de espermatozóides (PE) foi calculada usando a fórmula $PE = C \times V$, onde C é a concentração de espermatozóides e V é o volume de sêmen coletado.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SÊMEN

O sêmen foi centrifugado a $12000 \times g$ por 20 min e o plasma seminal foi retirado e acondicionado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até as dosagens químicas serem realizadas. O pH foi, imediatamente, determinado com o auxílio de fitas indicadoras na faixa de 6,4 a 8,0 com incremento de 0,2 unidades (Macherey-Nagel; Alemanha). As concentrações dos íons Na^+ , K^+ e Mg^{+2} (mmol l^{-1}) foram medidas por espectrofotometria de absorção atômica (Modelo – GBC 932 plus; Austrália), o Ca^{+2} (mmol l^{-1}) foi medido por fotômetro de chama (Digimed NK-2004; Brasil) e o Cl^- (mmol l^{-1}) foi determinado por kit colorimétrico (Doles; Brasil). Para a dosagem do Na^+ e Mg^{+2} o plasma seminal foi diluído $4000\times$ em água Miliq, o K^+ foi diluído $1000\times$ e o Ca^{+2} foi diluído $100\times$. Para a dosagem do Cl^- o plasma seminal não foi diluído. A osmolalidade (mosmol kg^{-1}) foi determinada usando um semi-micro osmômetro (Knauer; Alemanha).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados em percentual foram transformados para *arcsen*, antes das análises. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar se houve diferenças significativas nos parâmetros de qualidade do sêmen ao longo da estação reprodutiva. Quando as diferenças foram significativas, o teste de Tukey HSD para múltiplas comparações foi utilizado. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Uma análise de regressão linear foi realizada entre o espermatócrito e a concentração de espermatozóides. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. Todas as análises foram realizadas usando o software R versão 2.4.0. (Áustria, Viena).

RESULTADOS

No início da estação reprodutiva foi coletado o menor volume de sêmen ($250 \pm 71 \mu\text{l}$) ($P < 0,05$). Além disso, dois machos não espermiaram nesse período. Os maiores volumes de sêmen foram obtidos durante o meio ($450 \pm 65 \mu\text{l}$) e o final ($440 \pm 34 \mu\text{l}$) da

estação reprodutiva ($P<0,05$) (Fig. 2a). A maior concentração de células foi observada no início de estação reprodutiva atingindo $12,7\pm0,92 \times 10^9$ células ml^{-1} ($P<0,05$) (Fig. 2b). A produção de espermatozóides foi aumentando ao longo dos períodos monitorados, atingindo o máximo no final ($5,17\pm0,44 \times 10^9$ espermatozóides) da estação ($P<0,05$) (Fig. 2c).

Com relação ao espermatócrito, o menor valor foi observado no meio da estação reprodutiva, atingindo apenas 12%, sendo que a média ficou em $53\pm13\%$. Durante os três períodos de coletas foram observados espermatócritos de 100%. As maiores médias de espermatócrito foram observadas no início ($88\pm5\%$) e no fim ($76\pm4,0\%$) da estação reprodutiva ($P<0,05$) (Fig. 3). Uma relação positiva foi encontrada entre o espermatócrito e a concentração de células ($n=29$, R^2 ajustado = 0,67, $P<0,0001$) (Fig. 4).

Para o percentual de células móveis, nenhuma diferença foi observada durante os três períodos de coleta ($P>0,05$) (Fig. 5). Os valores ficaram próximos a 3, o que representa um percentual de células móveis superior a 50%, conforme a escala de motilidade utilizada neste estudo. Para o movimento progressivo houve um aumento no tempo de motilidade à medida que a estação foi progredindo para o seu final ($P<0,05$). O maior tempo de movimento progressivo foi observado no final da estação reprodutiva, atingindo 12 ± 1 min (Fig. 6). Para o movimento vibratório e o tempo total de motilidade, os menores valores foram observados no meio da estação reprodutiva, atingindo 86 ± 6 e 96 ± 5 min, respectivamente ($P<0,05$) (Fig. 6).

Para as concentrações dos íons K^+ , Mg^{+2} e Cl^- , assim como, para a osmolalidade e o pH nenhuma diferença ($P>0,05$) foi observada entre os três períodos de coleta (Tabela I). A concentração do íon Na^+ foi aumentando ao longo dos períodos monitorados, atingindo a maior concentração ($174,62\pm12,68$ mmol l^{-1}) no final da estação reprodutiva ($P<0,05$). Com relação ao íon Ca^{2+} , a menor concentração ($12,31\pm3,08$ mmol l^{-1}) foi observada no meio da estação ($P<0,05$), sendo que nenhuma diferença foi observada entre o início e o fim da estação reprodutiva ($P>0,05$) (Tabela I).

DISCUSSÃO

A produção e a qualidade do sêmen têm sido relatadas para algumas espécies marinhas (Suquet *et al.*, 1994; Mylonas *et al.*, 2003; Babiak *et al.*, 2006; Cabrita *et al.*, 2006). Entretanto, para o linguado *P. orbignyanus* esta é a primeira vez que são descritos parâmetros referentes à produção e a qualidade do sêmen durante o período reprodutivo.

Os volumes de sêmen coletados ao longo da estação reprodutiva foram baixos. Porém, esses valores são similares aos observados para o “turbot” *Psetta maxima* (L.) e o “yellow tail” *Pleuronectes ferrugineus* (Storer), onde o volume de sêmen produzido é inferior a 1 ml (Suquet *et al.*, 1994; Clearwater & Crim 1998). De acordo com Silveira *et al.* (1995) espermatozóides são encontrados nas gônadas masculinas de *P. orbignyanus* durante todo o ano. Esses mesmos autores, através de análises histológicas nas gônadas de fêmeas, também, observaram que o período reprodutivo desta espécie estende-se de outubro a abril devido à presença de ovócitos no estágio final de maturação. No presente estudo, o menor volume de sêmen foi observado no início da estação reprodutiva (outubro), além disso, dois machos não espermiaram nesse período. Nos dois períodos amostrados posteriormente o volume de sêmen coletado dobrou e todos os machos amostrados estavam espermiando. Os mesmos resultados foram observados para a produção de sêmen. Esses resultados indicam que embora o período reprodutivo do *P. orbignyanus* seja longo, o pico reprodutivo parece estar entre os meses de janeiro a abril.

A concentração de células encontradas para o sêmen de *P. orbignyanus* variou de 8,9 a $12,7 \times 10^9$ espermatozóides ml^{-1} sendo similares as observadas para outras espécies de linguado, tais como “turbot”, “starry” *Platichthys stellatus* (Pallas) e “Atlantic halibut” (Suquet *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 2002; Babiak *et al.*, 2006). Alterações na concentração celular ao longo da estação reprodutiva têm sido relatadas em diversas espécies marinhas. Por exemplo, para o “turbot” e o “Atlantic halibut” a concentração aumenta ao longo da estação reprodutiva (Suquet *et al.*, 1998; Babiak *et al.*, 2006), porém para o “sea bass” *Dicentrarchus labrax* (L.) e o “sea bream” *Sparus aurata* (L.) ocorre uma diminuição na concentração de espermatozóides (Kara & Labeled, 1994). Para o “red porgy” nenhuma alteração na concentração foi verificada durante a estação

reprodutiva (Mylonas *et al.*, 2003). Neste estudo, uma diminuição na concentração de espermatozóides foi verificada no meio do período reprodutivo.

O processo de espermição em peixes é regulado pelo aumento controlado do hormônio luteinizante (LH) na produção do plasma seminal, na qual aumenta a pressão intra-testicular e permite que os espermatozóides sejam transportados para o ducto espermático (Zohar & Mylonas, 2001). Dessa forma, uma diminuição na concentração das células no início ou ao longo da estação reprodutiva é esperada. Lim *et al.* (2002), trabalhando com o linguado “starry”, verificaram que machos tratados com GnRH α (Análogo do hormônio liberador das gonadotrofinas) apresentaram valores reduzidos na concentração de células e espermátócrito, porém um volume e uma produção de sêmen maior do que o grupo controle. No presente estudo durante os períodos monitorados, os menores valores de concentração de células e espermátócrito foram observados no meio da estação reprodutiva, o que pode indicar uma maior atuação dos hormônios gonadotróficos nesse período.

A produção de espermatozóides tem sido usada para caracterizar a contribuição dos machos em diferentes períodos reprodutivos em várias espécies (Suquet *et al.*, 1994). No “turbot”, Suquet *et al.* (1992) registraram uma produção de espermatozóides de $0,2 - 12 \times 10^9$ espermatozóides. Já Cabrita *et al.* (2006), trabalhando com “senegalese sole”, observaram valores menores variando de 50 a 110×10^6 espermatozóides. Neste trabalho os valores encontrados para a produção de espermatozóides foram similares aos observados para o “turbot” e atingiram o valor máximo no final da estação reprodutiva com $5,17 \times 10^9$ espermatozóides.

No presente estudo uma relação positiva foi encontrada entre espermátócrito e a concentração de espermatozóides o que corrobora o que tem sido evidenciado para outras espécies de teleósteos (Rakitin *et al.*, 1999, Rideout *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2005). Entretanto, em linguados os estudos são controversos na utilização dessa relação para estimar a densidade de espermatozóides. Suquet *et al.* (1992) trabalhando com “turbot” não encontraram relação entre esses dois parâmetros. Porém, Tvedt *et al.* (2001) trabalhando com “Atlantic halibut” encontraram uma boa relação, demonstrando que o espermátócrito pode ser uma técnica fácil, simples e rápida para estimar a concentração de células.

A avaliação da motilidade dos espermatozóides é um dos principais fatores relacionado à qualidade do sêmen em peixes (Rurangwa *et al.*, 2004). Neste estudo, nenhuma diferença no percentual de células móveis foi observada ao longo da estação reprodutiva. Para o “turbot” e o “Atlantic halibut” uma diminuição no percentual de células móveis e um aumento linear da concentração dos espermatozóides foi verificado durante a estação reprodutiva (Suquet *et al.*, 1998; Babiak *et al.*, 2006). Ambos os parâmetros são geralmente utilizados para avaliar o fenômeno do envelhecimento dos espermatozóides ao longo da estação reprodutiva (Billard *et al.*, 1995). Babiak *et al.* (2006) ilustraram outras mudanças na qualidade do sêmen do “halibut” durante a estação reprodutiva propondo que essas variações estão relacionadas aos processos de espermiogênese, hidratação e decomposição celular, na qual regulam a formação dos espermatozóides ao longo do período reprodutivo. De acordo com Silveira *et al.* (1995) indivíduos de *P. orbignyanus* viáveis para a reprodução são encontrados ao longo de todo o ano. Assim, os processos regulatórios na formação do sêmen de *P. orbignyanus* não são tão evidentes quanto o “Atlantic halibut” e o “turbot”, já que linguados em diferentes estádios de desenvolvimento dos espermatozóides podem ser encontrados durante todo o ano.

No presente trabalho foi observado que o tempo total de movimento dos espermatozóides do linguado *P. orbignyanus* é elevado. Porém, o tempo em que realmente os espermatozóides apresentaram um movimento progressivo foi em torno de 10 minutos, sendo que na grande parte do tempo os espermatozóides ficaram apenas vibrando. Trippel & Morgan (1994) trabalhando com bacalhau do atlântico *Gadus morhua* (L.) observaram esse mesmo processo, onde os espermatozóides tiveram um movimento progressivo durante alguns minutos e o restante do período (\cong 120 minutos) apenas vibraram. Rainis *et al.* (2005) estudaram o tempo total de motilidade dos espermatozóides da espécie marinha “sea bream” e de duas espécies de água doce, a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) e a “brown trout” *Salmo trutta* (L.), e verificaram que os espermatozóides do “sea bream” ficaram móveis por aproximadamente 50 min, enquanto as outras duas espécies não ultrapassaram 2 min. De acordo com esses autores, a diferença no tempo de motilidade entre as espécies está relacionada ao tipo de ambiente onde ocorre a fecundação. No caso do “sea bream” a fertilização ocorre em mar aberto onde os processos hidrodinâmicos são instáveis

diferentemente dos ambientes de água doce. Assim, os espermatozóides precisam nadar por um período mais longo para alcançarem os óvulos e realizarem a fertilização. Isto pode ilustrar porque os espermatozóides do *P. orbignyanus* apresentam um tempo de motilidade bastante longo.

Alterações na motilidade dos espermatozóides podem estar relacionadas a uma série de fatores, tais como: concentrações dos íons Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cl^- , pH, osmolaridade, temperatura e a taxa de diluição (Alavi *et al.*, 2004; Alavi & Cosson, 2005; Alavi & Cosson, 2006). No presente trabalho alterações no tempo de movimento progressivo, vibratório e total foram observadas ao longo da estação reprodutiva. Os menores tempos de movimento vibratório e total foram observados no meio da estação reprodutiva e coincidiu com a menor concentração de Ca^{2+} no plasma seminal. A concentração de K^+ também foi baixa nesse período, mas nenhuma diferença entre os períodos amostrados foi observada, já que houve uma alta variabilidade entre os indivíduos. Ao contrário do que ocorre para ciprinídeos e salmonídeos, a literatura sobre a influência de íons sobre a motilidade do sêmen em peixes marinhos é restrita. Em salmonídeos concentrações elevadas de K^+ no plasma seminal favorecem a inibição da motilidade (Alavi & Cosson, 2006). Em teleósteos marinhos, o K^+ não tem efeito inibitório sobre a motilidade como foi observado para o “summer white” *Sillago ciliata* (Cuvier), o linguado *Platichthys flesus* (L.) e o bacalhau do atlântico (Morisawa, 1985; Goodall *et al.*, 1989). Em espécies de água doce o Ca^{2+} influencia o período total de motilidade, o percentual de espermatozóides móveis e a velocidade. Em teleósteos marinhos, estudos mais recentes demonstram que o Ca^{2+} tem papel fundamental para que os espermatozóides se tornem móveis em osmolaridades mais elevadas (Alavi & Cosson, 2006). No presente estudo a diminuição das concentrações de Ca^{2+} e K^+ parecem estar relacionadas com a duração da motilidade dos espermatozóides.

Os íons Na^+ e Cl^- foram os íons predominantes no plasma seminal do linguado *P. orbignyanus* e coincidiram com a tendência de aumento da osmolalidade ao longo da estação reprodutiva. Wang & Crim (1997), trabalhando com o “ocean pout” *Macrozoarces americanus*, também observaram a mesma relação entre Na^+ , Cl^- e osmolalidade. Em termos gerais, a osmolalidade e as concentrações dos íons Na^+ , Cl^- e Mg^{2+} encontradas no plasma seminal do *P. orbignyanus* foram semelhantes ao “turbot” (Dreanno *et al.*, 1998). Entretanto, as concentrações dos íons Ca^{2+} e K^+ são diferentes,

sendo maiores no plasma seminal do *P. orbignyanus*. A concentração de K^+ é similar às observadas para algumas espécies de salmonídeos, já a concentração de Ca^{2+} é semelhante a espécies de água doce (Alavi & Cosson, 2006). Isto pode estar relacionado ao fato de que o *P. orbignyanus* é uma espécie estuarina-dependente o que pode influenciar na composição do plasma seminal dessa espécie.

Os valores obtidos para o pH do plasma seminal ficaram próximos a 6,70 e não diferiram ao longo da estação reprodutiva. Esses valores são menores do que os observados para o sêmen do “turbot” (7,1 a 7,6), do “starry flounder” (7,3 a 8,0) e do “Atlantic halibut” (7,3 a 7,6) (Dreanno *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2002; Babiak *et al.*, 2006), porém é semelhante ao “yellowtail flounder” (6,8) (Clearwater & Crim, 1998).

Em síntese, alterações na qualidade do sêmen do *P. orbignyanus* ocorrem durante a estação reprodutiva. As análises de volume, concentração celular, produção de espermatozóides e tempo de motilidade progressiva indicam que o pico reprodutivo dessa espécie ocorre entre os meses de janeiro a abril. Os íons Ca^{2+} e K^+ parecem estar relacionados com a duração da motilidade dos espermatozóides no *P. orbignyanus*. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para melhor avaliar a relação entre estes parâmetros. Além disso, o fenômeno de envelhecimento dos espermatozóides ao longo da estação reprodutiva, característico de outras espécies de linguado, não parece ser evidente no *P. orbignyanus*. De uma maneira geral, as informações obtidas nesse estudo podem auxiliar no manejo reprodutivo desta espécie e, conseqüentemente na seleção dos melhores reprodutores a serem utilizados na fertilização de desovas, assim como, no desenvolvimento de protocolos de resfriamento e criopreservação do sêmen.

Bibliografia

- Alavi, S. M. H. & Cosson, J. (2005). Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* **29**, 101-110.
- Alavi, S. M. H. & Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* **30**, 1-14.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., Amiri, B. M. & Akhoundzadeh, M. A. (2004). Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction* **128**, 819-828.

- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G. & Johnsen, S. (2006). Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* **65**, 1587-1604.
- Bianchini, A., Wasielesky, Jr. W. & Miranda, K. C. (1996). Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **56**, 453-459.
- Billard, R., Cosson J., Crim, L.W. & Suquet, M. (1995). Sperm physiology and quality. *In: Broodstock management and egg and larval quality*. Edited by N.R. Bromage & R.J. Roberts, pp. 25-52. Blackwell Science, Oxford.
- Borges, A., Siqueira, D. R., Jurinitz, D. F., Zanini, R., Amaral, F., Grillo, M. L., Oberst, E. R. & Wassermann, G. F. (2005). Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry* **31**, 45-53.
- Cabrita, E., Soares, F. & Dinis, M.T. (2006). Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* **261**, 967-975.
- Cerqueira, V.R. (2005). Egg Development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Brazilian Archives Biology and Technology* **48**, 459-465.
- Cerqueira, V. R., Mioso, R., Macchiavello, J. A. G. & Brugger, A. M. (1997). Ensaio de indução de desova do linguado, *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839. *Boletim do Instituto de Pesca* **24**, 247-254.
- Chao, N-H & Liao, I.C. (2001). Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* **197**, 161-189.
- Ciereszko, A., Glogowski, J. & Dabrowski, K. (2000). Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. *In: Cryopreservation in aquatic species*. pp. 20-48. Edited by T.R. Tiersch, and P.M. Mazik. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Clearwater, S. J. & Crim, L. W. (1998). Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **19**, 349-357.

- Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyères, E., Cosson, J., Delliou, H. L. & Billard, R. (1998). Effect of urine on semen quality in turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture* **169**, 247-262.
- Figueiredo, J.L. & Menezes, N.A. (2000). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. *Museu de zoologia / USP*. São Paulo. 116p.
- Goodall, J. A., Blackshaw, A. W. & Capra, M. F. (1989). Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliate*). *Aquaculture* **77**, 243-250.
- Kara, M. K. & Labed, S. (1994). Evolution des caractéristiques du sperme de *Sparus aurata* et *Dicentrarchus labrax* au cours d'une saison de reproduction. *Cahiers de Biologie Marine* **35**, 281-288.
- Lim, H. K., Han, H. S. & Chang, Y. J. (2002). Effects of gonadotropin-releasing hormone analog on milt production enhancement in starry flounder *Platichthys stellatus*. *Fisheries Science* **68**, 1197-1204.
- Morisawa, M. (1985). Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zoological Science* **2**, 605-615.
- Mylonas, C. C., Papadaki, M. & Divanach, P. (2003). Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research* **34**, 1161-1170.
- Radonic, M., Müller, M. I., López, A. V., Bambill, G. A., Spinedi, M. & Boccanfuso, J. J. (2007). Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina. *Ciencias Marinas* **33**, 187-196.
- Rainis, S., Gasco, L. & Ballestrazzi, R., (2005). Comparative study on milt quality features of different finfish species. *Italian Journal Animal Science* **4**, 355-363.
- Rakitin, A., Ferguson, M. M. & Trippel, E. A. (1999). Spermatozoa density and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* **170**, 349-358.
- Rideout, R. M., Trippel, E. A. & Litvak, M. K. (2004). Relationship between sperm density, spermatozoa density, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *Journal of Fish Biology* **65**, 319-332.

- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. & Nash, J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**, 1-28.
- Sahinöz, E., Aral, F. & Dogu, Z. (2007). Changes in Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning period. *Theriogenology* **67**, 848-854.
- Sampaio, L. A. & Bianchini, A. (2002). Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **269**, 187–196.
- Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V. & Robaldo, R.B. (2007). Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* **262**, 340-346.
- Silveira, M.P.M., Cousin, J.C.B. & Haimovici, M. (1995). Estrutura ovárica e testicular do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Atlântica* **17**, 137–152.
- Suquet, M., Omnes, M. H. Nomant, Y. & Fauvel, C. (1992). Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus muximus*). *Aquaculture* **101**, 177-185.
- Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C. & Fauvel, C. (1994). Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources* **7**, 283-294.
- Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J. L. & Billard, R. (1998). The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *Journal of Fish Biology* **52**, 31-41.
- Trippel, E. A. & Morgan, M. J. (1994). Sperm longevity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Copeia* **1994**, 1025–1029.
- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J. & Power, J. (2001). The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* **194**, 191-200.

- Wang, Z. & Crim, L. W. (1997). Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **16**, 77-83.
- Wasielesky, W. Jr., Bianchini, A. & Miranda, F. K. (1998). Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Maritimo* **17**, 43-48.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.

TABELA I: Parâmetros dosados no plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyana* durante o início ($n=13$), meio ($n=8$) e fim ($n=15$) da estação reprodutiva. Os valores estão representados como média \pm erro padrão. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos amostrados ($P<0,05$).

Parâmetros	Início	Meio	Fim
Na ⁺ (mmol l ⁻¹)	112,46 \pm 7,46 ^a	146,85 \pm 28,25 ^{ab}	174,62 \pm 12,68 ^b
Mg ²⁺ (mmol l ⁻¹)	8,30 \pm 1,57 ^a	10,47 \pm 2,45 ^a	4,61 \pm 0,70 ^a
K ⁺ (mmol l ⁻¹)	44,71 \pm 0,22 ^a	28,89 \pm 12,28 ^a	42,7 \pm 4,55 ^a
Ca ²⁺ (mmol l ⁻¹)	20,70 \pm 1,13 ^a	12,31 \pm 3,08 ^b	19,55 \pm 0,59 ^a
Cl ⁻ (mmol l ⁻¹)	100,15 \pm 4,58 ^a	113,59 \pm 4,41 ^a	142,25 \pm 10,87 ^a
pH	6,77 \pm 0,02 ^a	6,67 \pm 0,11 ^a	6,77 \pm 0,03 ^a
Osmolalidade (mosmol kg ⁻¹)	301,67 \pm 1,67 ^a	312,5 \pm 7,15 ^a	325,5 \pm 7,33 ^a

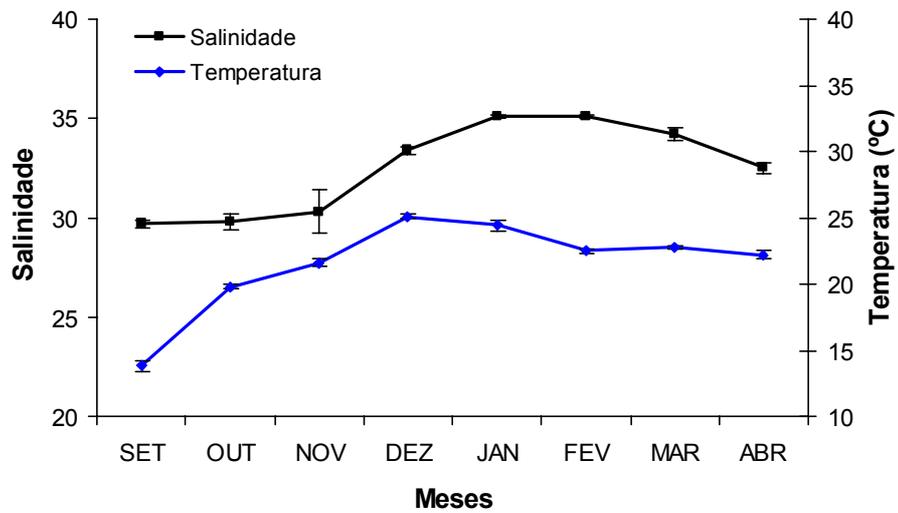


FIG. 1. Valores médio de temperatura e salinidade da água durante o período reprodutivo do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Os linguados foram coletados no início (outubro), meio (janeiro) e fim (abril) da estação reprodutiva.

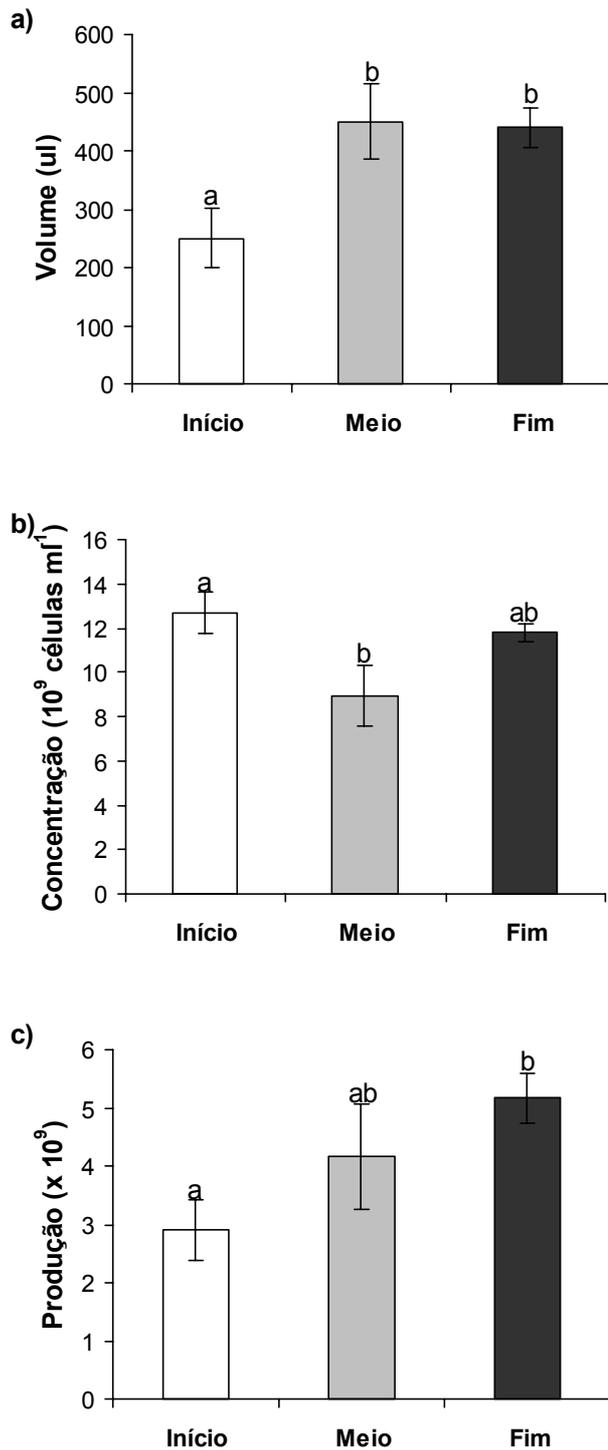


FIG. 2. Volume médio de sêmen coletado (a), concentração de espermatozoides (b) e produção de espermatozoides (c) durante a estação reprodutiva do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

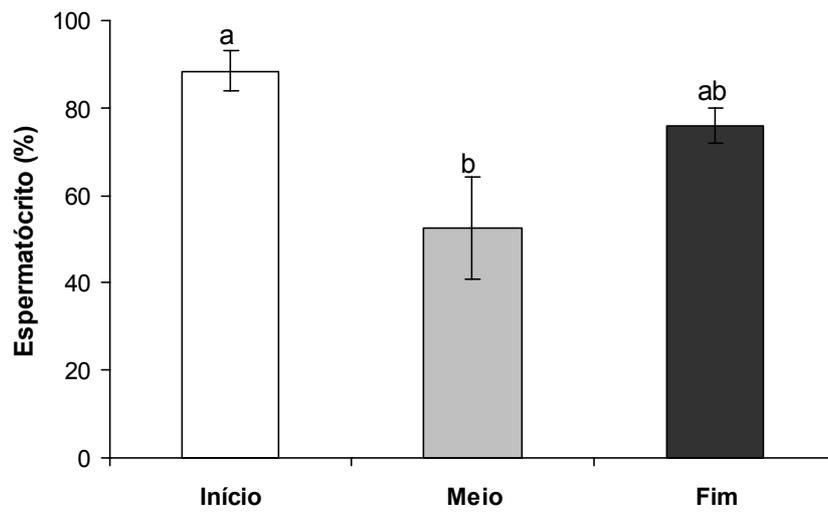


FIG. 3. Espermatócrito obtido durante a estação reprodutiva do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

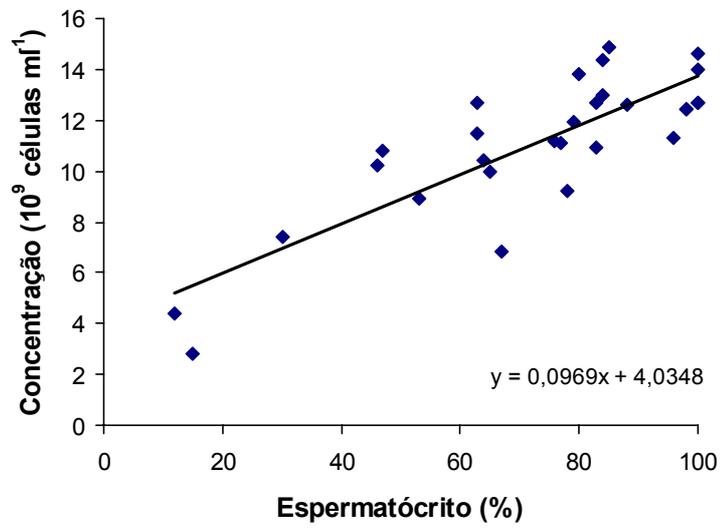


FIG. 4. Relação entre espermatócrito e concentração de espermatozóides para o sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* ($n=29$, r^2 ajustado = 0,67, $P<0,0001$).

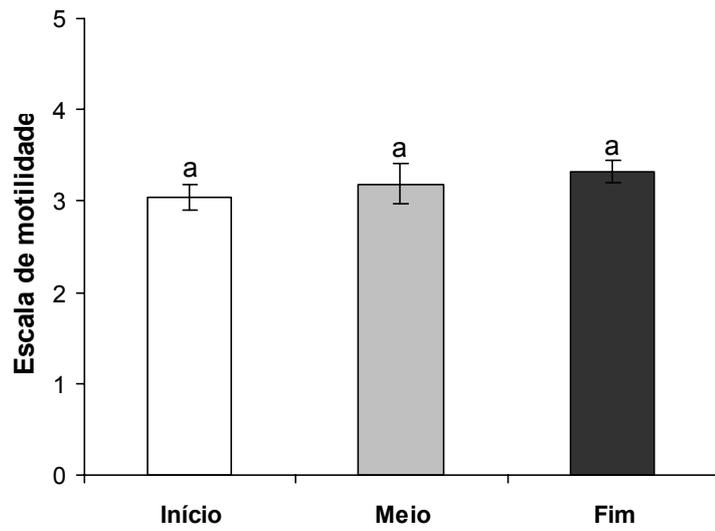


FIG. 5. Motilidade dos espermatozóides do linguado *Paralichthys orbignyanus* durante a estação reprodutiva. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. As letras iguais indicam que não há diferenças significativas ($P > 0,05$).

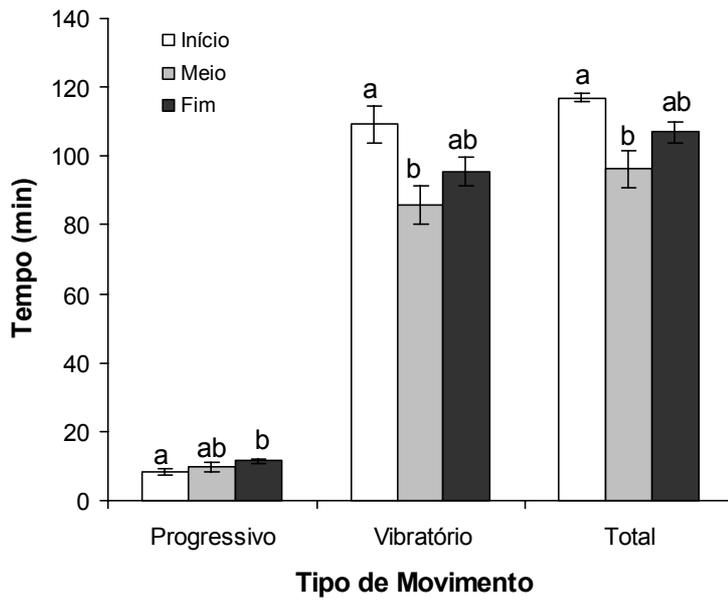


FIG. 6. Tempo de duração dos diferentes tipos de movimentos analisados para os espermatozóides do linguado *Paralichthys orbignyanus* durante a estação reprodutiva. Os dados estão expressos como média±erro padrão. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($P<0,05$).

Capítulo II

Criopreservação do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus*

Co-autores: Marcelo Okamoto, Paulo Varoni Cavalcanti, Tiago Collares, Vinicius Farias Campos, João Carlos Deschamps, Ricardo Berteaux Robaldo, Luis Fernando Marins e Luís André Sampaio

**Segundo normas da revista "Aquaculture"
Aceito para publicação**

Criopreservação do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus*

Carlos Frederico Ceccon Lanes¹, Marcelo Okamoto², Paulo Varoni Cavalcanti³, Tiago Collares³, Vinicius Farias Campos³, João Carlos Deschamps³, Ricardo Berteaux Robaldo⁴, Luis Fernando Marins¹, Luis André Sampaio²

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

² Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

³ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

⁴ Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

Autor para correspondência: L.A. Sampaio. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia, Av. Itália, Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande – RS, Brasil. Tel.: +55 53 3236 8131; Fax: +55 53 3236 8042. E-mail: sampaio@mikrus.com.br

Resumo

O linguado *Paralichthys orbignyanus* vem sendo considerado para aquicultura devido ao seu alto valor comercial. Estudos relacionados à reprodução e a larvicultura têm demonstrado a viabilidade da sua criação e técnicas que prolonguem e aumentem a viabilidade dos gametas podem auxiliar no desenvolvimento do cultivo dessa espécie. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de duas soluções crioprotetoras para a criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyanus* para auxiliar no manejo reprodutivo e, conseqüentemente, aumentar o potencial do seu cultivo. Para isso, foram testadas duas soluções crioprotetoras; uma contendo glicerol (12% ou 1,65M) diluído numa solução a base de sais (423 mM NaCl, 9 mM KCl, 9,25 mM CaCl₂.2H₂O, 22,92 mM MgCl₂.6H₂O, 25,5 mM MgSO₄.7H₂O and 2,15 mM NaHCO₃; pH 8,2; osmolalidade 900 mOsmol/kg) e outra contendo DMSO (10% ou 1,40M) diluído numa solução à base de sacarose (110 mM sacarose, 100 mM KHCO₃ and 10 mM Tris-Cl; pH 8,2; osmolalidade 335 mOsmol/kg). A criopreservação foi feita sem tempo de equilíbrio. As palhetas (250 µl) foram colocadas a 6 cm acima da superfície do nitrogênio líquido por 10 min, então foram transferidas para 1 cm da superfície do nitrogênio líquido por 5 min e em seguida mergulhadas no nitrogênio líquido. A qualidade do sêmen criopreservado foi avaliada através do percentual de células móveis, viabilidade celular e testes de fertilização, eclosão e viabilidade larval. A motilidade do sêmen foi verificada através de uma escala arbitrária de 0 a 5. A viabilidade do sêmen foi determinada usando um kit de viabilidade de espermatozóides denominado “LIVE/DEAD[®]”. A taxa de motilidade entre o sêmen fresco ($3,5 \pm 0,2$) e o sêmen criopreservado na solução contendo DMSO após o descongelamento ($2,5 \pm 0,3$) foram similares ($P > 0,05$). Por outro lado, a motilidade do sêmen criopreservado na solução contendo glicerol ($1,3 \pm 0,4$) foi menor do que os outros dois tratamentos ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa no percentual de espermatozóides vivos após o descongelamento entre a solução contendo DMSO ($43 \pm 9\%$) e a com glicerol ($19 \pm 8\%$). O mesmo foi observado entre o sêmen fresco ($60 \pm 6\%$) e o criopreservado com DMSO. Entretanto, a solução contendo glicerol teve um menor percentual de espermatozóides vivos do que o sêmen fresco ($60 \pm 6\%$) ($P < 0,05$). A motilidade dos espermatozóides foi correlacionada positivamente com o percentual de espermatozóides

vivos ($n=13$; R^2 ajustado = 0,61). Para as taxas de fertilização, eclosão e viabilidade larval nenhuma diferença foi observada entre os três tratamentos ($P>0,05$). Este é o primeiro estudo relatando o sucesso da criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyana*, o que deve melhorar o manejo reprodutivo dessa espécie e, conseqüentemente aumentar o potencial do seu cultivo.

Palavras-chave: Glicerol-salino; DMSO-sacarose; Sêmen; Espermatozóide; *Paralichthys orbignyana*; Reprodução.

Abstract

The Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, is being considered for aquaculture due to its high demand and market price. Reproduction and larviculture studies have demonstrated the feasibility of massive fingerling production, and techniques that prolong life and increase gamete viability can assist in the culture development of this species. The aim of this study was to evaluate the efficiency of two different cryosolutions for cryopreservation of Brazilian flounder semen in order to improve broodstock management and consequently augment the potential for its culture. Two different cryosolutions were tested: a) glycerol - saline: glycerol solution (12% or 1.65 M) along a saline-based diluent (423 mM NaCl, 9 mM KCl, 9.25 mM CaCl₂·2H₂O, 22.92 mM MgCl₂·6H₂O, 25.5 mM MgSO₄·7H₂O and 2.15 mM NaHCO₃; pH 8.2; osmolality 900 mOsmol/kg); and b) DMSO - sucrose: DMSO solution (10% or 1.40 M) along a sucrose-based diluent (110 mM Sucrose, 100 mM KHCO₃ and 10 mM Tris-Cl; pH 8.2; osmolality 335 mOsmol/kg). Cryopreservation was made without equilibration time. First, 250µl-straws were placed 6 cm above the surface of liquid nitrogen for 10 min, then they were maintained for 5 min on the surface of liquid nitrogen (1 cm) before being plunged into liquid nitrogen. The quality of cryopreserved sperm was assessed through of percentage of sperm motility and viability, fertilization capacity, hatching and larval viability. Motility was estimated with an arbitrary scale, ranging from 0 to 5. Spermatozoa viability was determined using a LIVE/DEAD[®] sperm viability kit. Motility of fresh sperm (3.5±0.2) was similar to frozen/thawed sperm with DMSO-sucrose (2.5±0.3) ($P>0.05$). On the other hand, the motility of frozen/thawed sperm with glycerol-saline (1.3±0.4) was lower than the other two treatments ($P<0.05$). No difference was found in the percentage of live spermatozoa post-thaw between DMSO-sucrose and glycerol-saline solutions ($P<0.05$). However, fresh sperm had a higher percentage of live spermatozoa than post-thaw sperm with glycerol-saline ($P<0.05$). Sperm motility was positively correlated with the percentage of live spermatozoa (Adjusted $R^2=0.61$, $n=13$). No difference was found for fertilization and hatching rates and larvae viability among the three treatments ($P>0.05$). This is the first report on successful cryopreservation of Brazilian flounder sperm. This procedure should

improve broodstock management techniques for this species and consequently augment the potential for its culture.

Key words: Glycerol-saline; DMSO-sucrose; Sperm; Spermatozoa; *Paralichthys orbignyanus*; Reproduction.

1. Introdução

O linguado *Paralichthys orbignyanus* é encontrado em regiões estuarinas e costeiras do litoral do Estado do Rio de Janeiro (Brasil) até Mar del Plata (Argentina) (Figueiredo & Menezes, 2000). O elevado preço de sua carne, a alta demanda de mercado e a redução das capturas são fatores que tem estimulado o cultivo dessa espécie. Estudos têm demonstrado que essa espécie tolera uma ampla faixa de temperatura (Wasielesky et al., 1998) e salinidade (Sampaio & Bianchini, 2002), assim como elevadas concentrações de compostos nitrogenados (Bianchini et al., 1996), características que favorecem o desenvolvimento do seu cultivo. Recentemente, trabalhos relacionados à reprodução (Bianchini et al., 2005; Radonic et al., 2007) e a larvicultura (Sampaio et al., 2007) demonstraram a possibilidade de produzir alevinos intensivamente.

A criopreservação de gametas tem sido utilizada como uma ferramenta para melhorar o manejo de reprodutores e, conseqüentemente aumentar a produção de larvas oriundas da fertilização artificial (Chereguini et al., 2003). Apesar dos esforços realizados para a criopreservação de óvulos e embriões, resultados satisfatórios ainda não foram obtidos nessa área. Até o momento, somente a criopreservação de sêmen tem sido realizada com sucesso em peixes (Chao & Liao, 2001).

Os benefícios da criopreservação do sêmen incluem: sincronização da disponibilidade de gametas, melhor aproveitamento do volume de sêmen disponível, redução de custos relativos à manutenção do plantel de reprodutores machos, facilitação do transporte de gametas, seleção dos gametas de melhor qualidade e conservação da variabilidade genética das populações de peixes que estão ameaçadas de extinção (Suquet et al., 2000).

A criopreservação do sêmen já foi realizada com sucesso em mais de 200 espécies de peixes (Suquet et al., 2000). Entretanto, as taxas de sucesso da criopreservação do sêmen têm sido altamente variáveis, entre as diferentes metodologias utilizadas, ou mesmo, entre indivíduos da mesma espécie (Billard, 1995). Com relação aos Pleuronectiformes, a criopreservação do sêmen de várias espécies já foi estudada, incluindo o “plaice” *Pleuronectes platessa* (Pullin, 1972), “Atlantic halibut” *Hippoglossus hippoglossus* (Bolla et al., 1987), “yellow tail” *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson et al., 1999), “winter flounder” *Pseudopleuronectes*

americanus (Rideout et al., 2003), “hirame” *Paralichthys olivaceus* (Zhang et al., 2003), “turbot” *Psetta maxima* (Chen et al., 2004) e o “spotted halibut” *Verasper variegates* (Liu et al., 2006). Na maioria desses estudos, os melhores resultados foram obtidos com o uso de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol ou propileno glicol como crioprotetores.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência de duas soluções crioprotetoras para a criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyianus*, uma contendo glicerol diluído numa solução a base de sais e outra contendo DMSO diluído numa solução à base de sacarose. A qualidade do sêmen criopreservado foi avaliada através do percentual de células móveis, viabilidade celular e testes de fertilização, eclosão e viabilidade larval.

2. Material e Métodos

2.1. Peixes

Os linguados utilizados nos experimentos de criopreservação foram capturados no meio da estação reprodutiva dessa espécie (Janeiro de 2007) na praia do Cassino (Rio Grande- Brasil, 32° 12' S - 52° 10' O) e encaminhados para a Estação Marinha de Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os machos (432 ± 96 g; 35 ± 2 cm média \pm erro padrão) foram mantidos no laboratório por no máximo 10 dias antes da coleta do sêmen. Os animais foram mantidos em tanques circulares (1000 l) na salinidade de 35 ‰ e temperatura de 25 ± 2 °C, com renovação diária de 100% da água. O fotoperíodo foi mantido em 14 horas luz e 10 horas escuro.

2.2. Coleta do sêmen

Para a coleta do sêmen os linguados foram anestesiados com benzocaína (50 ppm). Em seguida, seu abdômen foi seco e limpo com papel toalha. Durante a coleta, foram tomados cuidados para evitar a contaminação do sêmen com urina, sangue e fezes. O sêmen foi coletado utilizando seringas descartáveis graduadas (1 ml) sem agulha através de extrusão manual e imediatamente transferido para microtubos de 1,5 ml.

2.3. Caracterização do sêmen

Antes de ser criopreservado, o sêmen coletado de cada macho foi observado sob microscópio para verificar se os espermatozóides estavam em movimento devido à contaminação com urina ou água salgada, no caso de estarem ativos o sêmen foi descartado. O sêmen foi ativado com água salgada (35‰ \approx 1050 mOsmol/kg) através de uma diluição 1:50 (1 μ l de sêmen e 49 μ l de água salgada). A motilidade dos espermatozóides foi estimada em microscópio óptico (Olympus CX-41) sob o aumento de 400 \times usando uma escala arbitrária, na qual 0 representa 0%, 1 \equiv 1-25%, 2 \equiv 26-50%, 3 \equiv 51-75%, 4 \equiv 76-90% e 5 \equiv 91-100% de espermatozóides móveis (Borges et al., 2005). Somente as amostras com motilidade superior a 50% (≥ 3), após ativação com água salgada, foram utilizadas.

A concentração de espermatozóides foi determinada usando uma câmara de Neubauer espelhada. O sêmen foi fixado em formalina 4% e diluído em água destilada (1:2000). Antes da contagem as amostras foram deixadas por cerca de 10 minutos na câmara de Neubauer para o assentamento das células e, posteriormente, as contagens foram realizadas usando um microscópio sob aumento de 400 \times .

2.4. Criopreservação do sêmen

Os crioprotetores e as soluções diluentes utilizadas neste estudo foram:

- a) Glicerol – salino: solução contendo glicerol (12% ou 1,65M) diluído numa solução a base de sais (423 mM NaCl, 9 mM KCl, 9,25 mM CaCl₂.2H₂O, 22,92 mM MgCl₂.6H₂O, 25,5 mM MgSO₄.7H₂O and 2,15 mM NaHCO₃; pH 8,2; osmolalidade 900 mOsmol/kg) (Zhang et al., 2003);
- b) DMSO – sacarose: solução de DMSO (10% ou 1,40M) diluído numa solução a base de sacarose (110 mM Sacarose, 100 mM KHCO₃ and 10 mM Tris-Cl; pH 8,2; osmolalidade 335 mOsmol/kg) (Chen et al., 2004).

O sêmen de sete machos foi individualmente dividido em duas amostras e foi diluído 1:3 (v/v; sêmen: diluente+crioprotetor) nas soluções de glicerol e DMSO pré-resfriadas a 5°C. Antes da criopreservação, nenhuma solução ativou o sêmen. Para cada macho, três palhetas (250 μ L - IMV; França) foram preenchidas com as diferentes soluções crioprotetoras e foram seladas com massa de modelar. A criopreservação foi feita sem tempo de equilíbrio, as palhetas foram colocadas a 6 cm acima da superfície do nitrogênio líquido por 10 min, então foram transferidas para 1 cm da superfície do

nitrogênio líquido por 5 min e em seguida mergulhadas no nitrogênio líquido, seguindo a curva de congelamento descrita por Chen et al. (2004).

2.5. Motilidade e viabilidade do sêmen descongelado

Após 24 horas de congelamento, duas palhetas (uma contendo a solução com glicerol e outra com DMSO) de cada macho foram descongeladas por imersão em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. A motilidade do sêmen descongelado foi imediatamente avaliada, conforme descrito anteriormente.

A viabilidade do sêmen descongelado foi determinada usando um kit de viabilidade de espermatozóide denominado “LIVE/DEAD[®]” (Molecular Probes, USA). Utilizando um microscópio de epifluorescência, as células vivas (membrana íntegra) tornam-se verdes devido à presença do corante SYBR 14, enquanto, as células mortas (membrana danificada) ficam vermelhas devido à incorporação do corante iodeto de propídio. Para a realização das reações 10 µl de sêmen foram colocados em um microtubo de 1,5 ml e diluídos em 500 µl de BPSE (5 g/l C₆H₁₂O₆, 0,34 g/l MgCl₂, 0,64 g/l C₆H₅K₃O₇, 4,30 g/l NaC₂H₃O₂, 8,67 g/l C₅H₈NO₄Na, 1,95 g/l C₆H₁₅NO₆S, 0,75 g/l KH₂PO₄, 12,70 g/l K₂HPO₄, pH 7,5 e osmolalidade 333 mOsm/kg). Foram utilizados 1µL de SYBR 14 (20 nM/µl) e 2,5 µl de iodeto de propídio (2,4 mM/µl) para cada reação. As soluções foram incubadas durante 10 min e, posteriormente, foram analisadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX 60) (excitação = 450 a 480nm e emissão = 520nm). A viabilidade dos espermatozoides foi calculada como a proporção entre o número de células vivas em relação ao número total de células contadas.

2.6. Avaliação das taxas de fertilização, eclosão e viabilidade larval

Após um mês da criopreservação ser realizada, a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado (DMSO-sacarose a glicerol-salino) foi comparada ao sêmen fresco. Os detalhes do desenho experimental dos testes de fertilização podem ser visualizados na Tabela 1. Machos novos foram usados para coletar o sêmen fresco. Para os testes de fertilização foram utilizadas três fêmeas (1476±212 g; 50±3 cm). As fêmeas foram induzidas com extrato de hipófise de carpa (5 mg/kg). Os óvulos foram obtidos através de massagem abdominal sendo colocados em um becker plástico de 500 ml.

Uma concentração mínima de 80000 espermatozóides/ovo foi utilizada. Cerca de 70 µl de sêmen de cada palheta foi utilizado para fertilizar 2 ml de óvulos (≈1800 óvulos) numa placa de Petry. Imediatamente após o sêmen entrar em contato com os óvulos, 2 ml de água salgada (35 ‰) foram adicionados e gentilmente misturados para ativação dos espermatozóides. Após 10 min de contato, os ovos foram lavados com água salgada e transferidos para uma proveta de 10 ml, onde o percentual de ovos flutuantes foi determinado.

O percentual de fertilização foi avaliado após 2 horas. Aproximadamente 100 ovos flutuantes foram colocados numa lâmina escavada e observados sob uma lupa estereoscópica (Wild Heerbrugg, Suíça) em aumento de 16×. Os ovos no estágio de 4 a 8 células foram considerados fertilizados.

A taxa de eclosão foi estimada de amostras de 50 ovos flutuantes. Esses foram separados e colocados em potes plásticos contendo 800 ml de água salgada (35 ‰) e foram mantidos numa incubadora (Tecnal TE-401, Brasil) a 23 °C até o momento da eclosão (aproximadamente 40 horas). Para cada teste de fertilização, a taxa de eclosão foi repetida 3 vezes, sendo que a taxa de eclosão foi calculada como a média desses 3 valores. A taxa de eclosão foi expressa como o percentual de larvas eclodidas em relação ao número total de ovos flutuantes incubados.

Após a eclosão, 30 larvas de cada teste de fertilização foram analisadas para avaliar a proporção de larvas normais obtidas. As larvas foram consideradas viáveis quando não apresentaram curvatura na coluna vertebral e má formação da nadadeira. A viabilidade larval (V_l) foi calculada utilizando a seguinte fórmula $V_l = (L_n \times T_e)/100$, onde L_n é o percentual de larvas normais e T_e é a taxa de eclosão.

2.7. Análises estatísticas

Os dados em percentual foram transformados para arcsen com a finalidade de seguir as determinações da análise de variância. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar se houve diferenças significativas no percentual de células móveis, na viabilidade celular, nas taxas de ovos flutuantes, fertilização, eclosão e viabilidade larval entre os diferentes tratamentos. Quando as diferenças foram significativas, o teste de múltiplas comparações Tukey HSD foi utilizado para comparação. As diferenças entre os resultados obtidos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Uma

análise de regressão linear foi realizada entre a taxa de motilidade e o percentual de espermatozóides vivos. Os dados estão representados como média±erro padrão. Todas as análises foram realizadas usando o software R versão 2.4.0 (Viena, Áustria).

3. Resultados

O volume médio de sêmen coletado de cada macho foi de 475 ± 17 μ l. A concentração média de espermatozóides foi de $1,08\pm 0,06 \times 10^{10}$ células/ml.

A motilidade média do sêmen fresco foi de $3,5\pm 0,2$. Os espermatozóides criopreservados com glicerol apresentaram movimento logo após o descongelamento, mesmo sem terem sido ativados. A motilidade atingiu $0,92\pm 0,3$ nesse caso. O mesmo não foi observado no sêmen criopreservado com DMSO, onde só foram observadas células em movimento após ativação com água salgada. A motilidade dos espermatozóides criopreservados com DMSO ($2,5\pm 0,3$) foi significativamente maior que aquela apresentada no tratamento com glicerol ($1,3\pm 0,4$) após ativação da motilidade com água salgada ($P<0,05$). Não houve diferença significativa entre a motilidade do sêmen fresco e a do sêmen criopreservado em DMSO após o descongelamento ($P>0,05$) (Fig. 1).

O percentual de células viáveis foi de $60\pm 6\%$ para o sêmen fresco, $43\pm 9\%$ para o sêmen criopreservado na solução contendo DMSO e $19\pm 8\%$ na solução contendo glicerol (Fig. 2). A diferença entre o sêmen fresco e o criopreservado na solução contendo glicerol foi significativa ($P<0,01$), não tendo sido observado diferença significativa entre as células criopreservadas ($P>0,05$). Foi verificada uma relação positiva entre a motilidade e o percentual de espermatozóides vivos ($n=13$, R^2 ajustado = $0,61$, $P<0,001$) (Fig. 3).

Com relação aos testes de fertilização, nenhuma diferença foi verificada no percentual de ovos flutuantes, fertilização, eclosão e na viabilidade larval comparando o sêmen fresco e o criopreservado, independente da solução crioprotetora empregada ($P>0,05$) (Tabela 2).

4. Discussão

Neste estudo foi demonstrado que os protocolos de criopreservação utilizados são eficazes na criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyanus*. O sêmen criopreservado com as diferentes soluções crioprotetoras resultou em larvas viáveis, entretanto, considerando todos os parâmetros, a combinação DMSO-sacarose aparentemente forneceu resultados melhores do que a combinação glicerol-salino.

O DMSO e o glicerol são os crioprotetores mais utilizados para a criopreservação do sêmen de peixes marinhos (Suquet et al., 2000). Na maior parte dos estudos, o DMSO fornece os melhores resultados, provavelmente, devido a sua rápida penetração celular e a sua interação com os fosfolipídios da membrana celular que parecem facilitar o processo de criopreservação (Suquet et al., 2000). Já, o glicerol parece não ser tão eficiente, possivelmente devido aos efeitos tóxicos, o stress osmótico causado às células e a sua baixa capacidade de penetrar nos espermatozoides (Stoss, 1983). Além disso, sua eficiência na criopreservação parece ser espécie-específica (Suquet et al., 2000). Os espermatozoides criopreservados com a solução contendo glicerol estavam móveis logo após o descongelamento sem que houvesse a ativação com água salgada. Em peixes, a motilidade dos espermatozoides é controlada através do choque osmótico e da concentração iônica. Em espécies de água doce a motilidade do sêmen é induzida por um choque hipo-osmótico, enquanto em espécies marinhas os espermatozoides ficam ativos após um choque hiper-osmótico (Alavi & Cosson, 2006). Dessa forma, é provável que a solução extensora utilizada em conjunto com o glicerol devido à alta osmolalidade tenha promovido um choque hiper-osmótico, permitindo que as células ficassem móveis, mesmo sem terem sido ativadas com água salgada. Quando a criopreservação foi realizada, os espermatozoides não ficaram móveis, entretanto as soluções crioprotetoras estavam a 5 °C, o que deve ter inibido a motilidade do sêmen.

A motilidade e viabilidade do sêmen criopreservado com DMSO foram duas vezes superiores às obtidas com glicerol. Em termos gerais, as taxas de motilidade e viabilidade dos espermatozoides obtidos com a solução contendo glicerol foram baixas, porém isso não se refletiu nas taxas de fertilização e eclosão, o que pode ser explicado por dois fatores. Primeiro, a relação de espermatozoides/ovo utilizada pode ter sido suficientemente alta para proporcionar o encontro de espermatozoides viáveis com os óvulos, mesmo sob reduzida taxa de viabilidade espermática. Para o “turbot” foi

encontrada uma relação ótima de 6000:1 (espermatozóides/ovo) (Suquet et al., 1995), entretanto para outras espécies como o “wolfish” *Anarhichas lupus* essa relação pode atingir 200000:1 (Mokness & Pavlov, 1996). Para o linguado *P. orbignyanus* a relação ideal de espermatozóides/ovo ainda não é conhecida e precisa ser avaliada. Outro fator que pode ter influenciado, é a capacidade de fertilização dos espermatozóides que estavam apenas com movimento vibratório ou mesmo imóveis. Isso já foi demonstrado para salmonídeos (Scott & Baynes, 1980), para o bacalhau do atlântico *Gadus morhua* (Trippel & Neilson, 1992) e para o “rosy barb” *Barbus conchoni* (Amanze, 1994).

A avaliação da viabilidade dos espermatozóides utilizando o kit de fluorescência “LIVE/DEAD[®]” tem sido empregada com sucesso para diferentes espécies de peixes (DeGraaf & Berlinsky, 2004; Flajshans et al., 2004; Linhart et al., 2005). No presente trabalho esse kit também funcionou de maneira eficiente para avaliar o percentual de células viáveis após o descongelamento do sêmen. Além disso, uma relação positiva foi encontrada entre a viabilidade dos espermatozóides e a taxa de motilidade. DeGraaf & Berlinsky (2004) trabalhando com bacalhau do atlântico e “haddock” *Melanogrammus aeglefinus* encontraram uma relação positiva entre esses dois parâmetros. Por outro lado, Linhart et al. (2005) trabalhando com o sêmen do “catfish” *Silurus glanis* não encontraram nenhuma relação. De acordo com esses autores, uma relação não foi encontrada, pois os espermatozóides vivos não compreendem apenas os móveis, mas, também, aqueles na qual o conteúdo de ATP já acabou e estão imóveis. Entretanto esse processo não foi verificado no presente estudo, o que pode ser explicado pelo fato de que os espermatozóides do linguado *P. orbignyanus* ficam ativos por muito tempo (mais de 60 minutos, dados não publicados) o mesmo acontecendo com os espermatozóides do bacalhau do Atlântico (Trippel & Morgan, 1994) e do “haddock” (Rideout et al., 2004). Por outro lado, os espermatozóides do catfish ficam ativos por apenas cerca de 70 segundos (Linhart & Billard, 1994) o que pode fazer com que a estimativa do percentual de células móveis seja subestimada e não seja encontrada uma relação com a viabilidade.

A maior parte dos estudos relacionados a criopreservação do sêmen de peixes tem focado na obtenção de diluentes e crioprotetores adequados para a utilização dessa metodologia de um modo eficaz na aqüicultura. Além disso, os parâmetros mais comumente analisados são as taxas de fertilização e eclosão para verificar se o

protocolo empregado foi eficiente. Entretanto, poucos estudos analisam a viabilidade das larvas obtidas com o sêmen criopreservado. Esses estudos incluem avaliação das taxas de crescimento (Suquet et al., 1998; Chereguini et al., 2002) e percentual de larvas mal formadas obtidas com sêmen criopreservado (Rideout et al., 2003; Miskolczi et al., 2005). Da mesma forma que o registrado para o “winter flounder” e o “catfish” *Clarias gariepinus*, neste trabalho não foram observadas diferenças na proporção de larvas mal formadas entre o sêmen fresco e o criopreservado (Rideout et al., 2003; Miskolczi et al., 2005).

Os resultados do presente estudo demonstram que os protocolos de criopreservação utilizados são eficientes, mas aparentemente a combinação DMSO-sacarose é melhor do que a combinação glicerol-salino para a criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyanus*. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para avaliar a eficiência de outros diluentes, assim como, a concentração de crioprotetor ideal que deve ser empregada no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de sêmen (Suquet *et al*, 2000; Chao and Liao, 2001). Este é o primeiro estudo relatando o sucesso da criopreservação do sêmen do linguado *P. orbignyanus*, o que deve melhorar o manejo reprodutivo dessa espécie e, conseqüentemente, aumentar o potencial do seu cultivo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo MCT/CNPq – Edital Universal (Processo 483360/2007-4). C.F.C. Lanes é estudante do Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura da FURG e possui uma bolsa de estudos do CNPq. L.A. Sampaio é bolsista de produtividade do CNPq (Processo 301673/2006-3).

Bibliografia

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biol. Int.* 30, 1-14.
- Amanze, D., 1994. Strategies for sperm– egg contact during external fertilization in teleosts. *High performance fish: Proceedings of an International Fish Physiology*

- Symposium at the University of British Columbia in Vancouver, Canada, July 16–21 1994. Fish Physiology Association, Vancouver, BC, Canada, pp. 176-181.
- Bianchini, A., Wasielesky, Jr.W., Miranda, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 453- 459.
- Bianchini, A., Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., 2005. Cultivo de linguado *Paralichthys orbignyanus*. In: Baldisserotto, B; Gomes, L.C. (Eds.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 445-470.
- Billard, R., Cosson J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995. Sperm physiology and quality. In: Broodstock management and egg and larval quality (ed. by N.R. Bromage & R.J. Roberts), pp. 25-52. Blackwell Science, Oxford.
- Bolla, S., Holmefjord, I., Refstie, T., 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. Aquaculture 65, 371-374.
- Borges, A., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Zanini, R., Amaral, F., Grillo, M.L., Oberst, E.R. Wassermann, G.F., 2005. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in sperm characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). Fish Physiol. Biochem. 31, 45-53.
- Chao, N-H, Liao, I.C., 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture 197, 161-189.
- Chen, S.L., Ji, X.S., Yu, G.C., Tian, Y.S., Sha, Z.X., 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. Aquaculture 236, 547-556.
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Rasines, I., Fernandez, A., 2002. Growth and survival of young turbot (*Scophthalmus maximus* L.) produced with cryopreserved sperm. Aquaculture Res. 33, 637-641.
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Herrera, M., Martinez, C., De la Hera, M., 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Aquaculture Res. 34, 739-747.
- DeGraaf, J.D., Berlinsky, D.L., 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. Aquaculture 234, 527-540.

- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. *Museu de zoologia / USP*. São Paulo. 116p.
- Flajshans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biol. Int.* 28, 955-959.
- Linhart, O., Billard, R., 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis* L) after implantation of GnRH analogs and injection of carp pituitary extract. *J. Appl. Ichthyol.* 10, 182-188.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D., Kocour, M., 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology* 51, 250-261.
- Liu, X., Zhang, S., Zhang, Y., Xu, Y., 2006. Cryopreservation of the sperm of spotted halibut *Verasper variegates* (Pleuronectiformes, Pleuronectidae). *Indian J. Mar. Sci.* 35, 24-28.
- Miskolczi, E., Mihálffy, S., Várkonyi, E.P., Urbányi, B., Horváth, A., 2005. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 247, 119-125.
- Mokness, R., Pavlov, D.A., 1996. Management by life cycle of wolfish, *Anarhichas lupus* L., a new species for cold water aquaculture: a technical paper. *Aquaculture Res.* 27, 865-883.
- Pullin, R.V.S., 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperature. *Aquaculture* 1, 279-283.
- Radonic, M., Müller, M.I., López, A.V., Bambill, G.A., Spinedi, M., Boccanfuso, J.J., 2007. Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina. *Cienc. Mar.* 33, 187-196.
- Richardson, G.F., Wilson, C.E., Crim, L.W., Yao, Z., 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) sperm in large straws. *Aquaculture* 174, 89-94.
- Rideout, R.M., Litvak, M.K., Trippel, E.A., 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Res.* 34, 653-659.

- Rideout, R.M., Trippel, E.A., Litvak, M.K., 2004. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *J. Fish Biol.* 65, 319-332.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187-196.
- Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V., Robaldo, R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262, 340-346.
- Scott, A.P., Baynes, S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17, 707-739.
- Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: Donaldson E.M., Hoar W.S. Randall, D.J., (Eds), *Fish Physiol.*, vol. 9. Academic Press New York, pp. 305-350.
- Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Norman, Y., Fauvel, C., 1995. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture* 133, 83-90.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Res.* 31, 231-243.
- Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H., Billard, R., 1998. Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquat. Living Resour.* 11, 45-48.
- Trippel, E.A., Neilson, J.D., 1992. Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2118-2127.
- Trippel, E.A., Morgan, M.J., 1994. Sperm longevity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Copeia* 1994, 1025-1029.
- Wasielesky, W.J., Bianchini, A., Miranda, F.K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Maritimo* 17, 43-48.
- Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xua, Y.Y., Wang, C.L., Sawant, M.S., Lid, J., Chen, S.L., 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology* 60, 989-996.

Tabela 1. Desenho experimental utilizado para avaliar a capacidade de fertilização do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* criopreservado com DMSO-sacarose e glicerol-salino. Dez fertilizações foram realizadas para cada solução. Todas as fêmeas foram fertilizadas com sêmen fresco (controle).

	DMSO – sacarose					Glicerol - salino				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
♀ 1	x *	x	x	x		x	x	x	x	
♀ 2		x	x	x	x		x	x	x	x
♀ 3	x				x	x				x

* Sêmen do macho número 1 criopreservado com DMSO-sacarose utilizado para fertilizar os óvulos da fêmea número 1.

Tabela 2. Percentual de ovos flutuantes, fertilização, eclosão e viabilidade larval obtidas com o sêmen fresco e criopreservado do linguado *Paralichthys orbignyanus*.

Parâmetros	Fresco	DMSO-sacarose	Glicerol-salino
Ovos flutuantes (%)	94 ± 2^a	94 ± 1^a	94 ± 1^a
Fertilização (%)	73 ± 5^a	78 ± 5^a	61 ± 6^a
Eclosão (%)	63 ± 4^a	67 ± 3^a	53 ± 7^a
Viabilidade larval (%)	58 ± 5^a	60 ± 5^a	45 ± 8^a

Os dados ($n=10$) estão representados como média±erro padrão. As letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$).

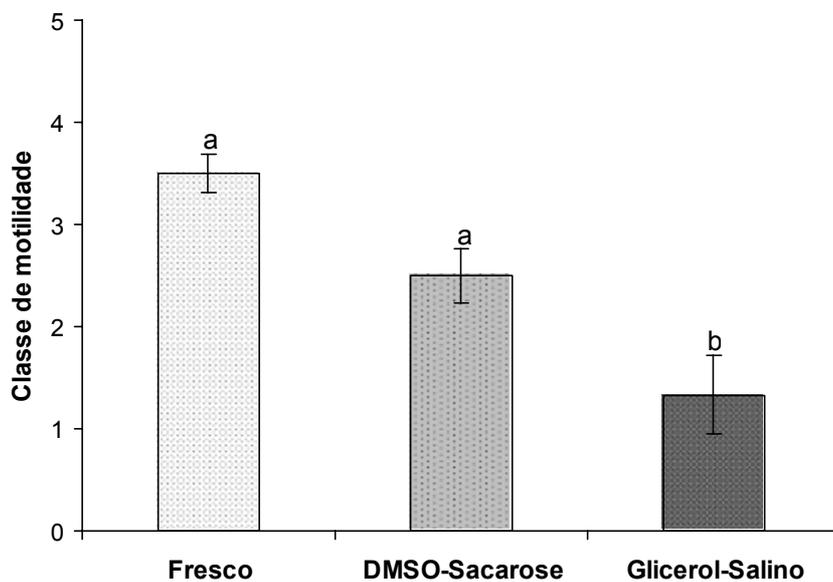


Fig.1. Motilidade dos espermatozoides ($n=7$) do sêmen fresco e criopreservado do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P<0,05$). Os dados estão representados como média \pm erro padrão.

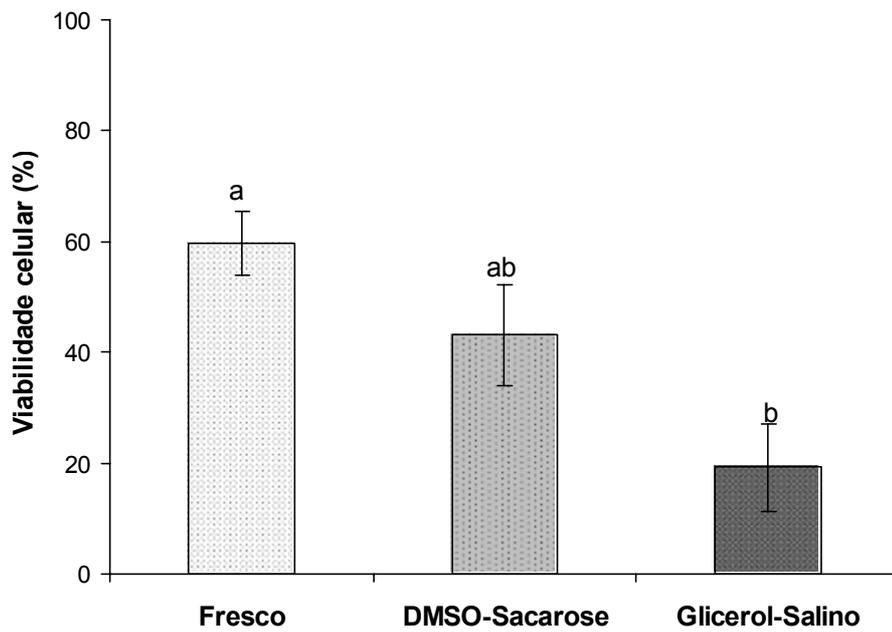


Fig.2. Percentual de espermatozoides vivos ($n=7$) determinado pelo kit “LIVE/DEAD®” para o sêmen fresco e criopreservado do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P<0,05$). Os dados estão representados como média \pm erro padrão.

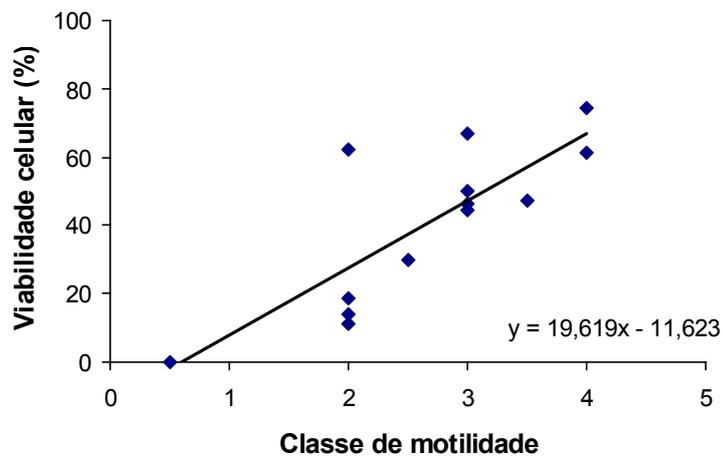


Fig. 3. Relação entre a motilidade dos espermatozóides e o percentual de espermatozóides vivos determinado pelo kit “LIVE/DEAD[®]” para o sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* ($n=13$, R^2 ajustado = 0,61, $P<0,001$).

Capítulo III

Avaliação da atividade da enzima DNase no plasma seminal e incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides do linguado *Paralichthys orbignyanus*

Co-autores: Luís André Sampaio e Luis Fernando Marins

**Segundo normas da revista "Theriogenology"
Submetido para publicação**

Avaliação da atividade da enzima DNase no plasma seminal e incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides do linguado *Paralichthys orbignyanus*

Carlos Frederico Ceccon Lanes¹, Luis André Sampaio² e Luis Fernando Marins¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

Autor para Correspondência: L.F. Marins. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Av. Itália, Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande - RS, Brasil. Tel.: +55 53 32336851. E-mail: dqmluf@furg.br.

Resumo

A transferência de genes mediada por espermatozóides (TGME) já foi realizada com sucesso em mamíferos, aves, anfíbios e alguns invertebrados. Em peixes, esta metodologia falhou ou produziu baixas taxas de peixes transgênicos. Isto ocorre devido aos poucos estudos realizados para avaliar os processos que regulam a interação entre DNA exógeno e espermatozóides. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar alguns fatores limitantes na incorporação do DNA exógeno pelas células espermáticas e usar essas informações para desenvolver um protocolo de incorporação de DNA para o sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Neste estudo, foi observada uma forte atividade da enzima DNase no plasma seminal do linguado *P. orbignyanus*. Entretanto, foi verificado que a atividade dessa enzima pode ser eliminada ou diminuída lavando o sêmen com soluções contendo EDTA. Três diferentes soluções de lavagem foram testadas e todas tiveram a capacidade de manter a qualidade do sêmen. Além disso, foi verificado que uma quantidade de DNA similar ou inferior a 50 ng/10⁶ espermatozóides deve ser usada na TGME em peixes. Por último, foi demonstrado que os espermatozóides do linguado *P. orbignyanus* são capazes de incorporar o DNA exógeno espontaneamente após a eliminação da atividade das DNases. Isto ficou evidente através da amplificação do DNA exógeno através de PCR usando o DNA genômico dos espermatozóides como molde, após eles terem sido tratados com DNase I. O protocolo desenvolvido nesse estudo abre uma perspectiva interessante na produção de peixes transgênicos através da TGME e, conseqüentemente, no melhoramento genético de espécies marinhas como o linguado *P. orbignyanus*.

Palavras-chave: DNase; Espermatozóides; Incorporação de DNA; *Paralichthys orbignyanus*

Abstract

Sperm mediated gene transfer (SMGT) have been successfully used in mammals, amphibians, birds and some invertebrates. In fish, this methodology failed or had low efficiency for transgenic production. This occurs due to few studies carried out to evaluate the processes that regulate the interaction between sperm and exogenous DNA. This way, the aim of this study was to evaluate some limitant factors in exogenous DNA uptake by fish spermatozoa and to develop a SMGT protocol to the Brazilian flounder *P. orbignyanus* sperm. In this study, it was observed a strong DNase activity in *P. orbignyanus* seminal plasma. However, it was verified that DNase activity can be eliminated or decreased washing the sperm with EDTA-containing solutions. Three different washing solutions were tested and all of them have maintained the sperm quality. Moreover, it was verified that an amount of exogenous DNA similar or inferior to 50 ng/10⁶ cells should be used in fish SMGT. At last, it was demonstrated that fish spermatozoa are capable to uptake exogenous DNA spontaneously after DNase activity elimination. This was evidenced through exogenous DNA amplification by PCR using spermatozoa genomic DNA as template after DNase I treatment. The obtained results provide an interesting perspective in transgenic fish production through SMGT and genetic improvement of sea species such as the Brazilian flounder *P. orbignyanus*.

Key words: DNase; Spermatozoa; DNA uptake; *Paralichthys orbignyanus*

1. Introdução

Atualmente, uma série de técnicas está disponível para produzir peixes transgênicos, como a microinjeção em ovos recém fertilizados [1], eletroporação de ovos e sêmen [2,3], lipofecção em tecidos gonadais [3], uso de vetores retrovirais [4] e biobalística [5]. Destas, a microinjeção é a técnica que tem sido mais utilizada e aplicada com sucesso na produção de peixes transgênicos. Entretanto, a microinjeção é uma técnica trabalhosa e limitada por certas características dos ovos de determinadas espécies (ovos pequenos, córion rígido, pouca transparência, etc.) [6]. Para a maioria das espécies marinhas, técnicas de transferência de genes altamente eficientes ainda não foram estabelecidas. Dessa forma, em espécies marinhas como o linguado *Paralichthys orbignyanus* que produzem ovos pequenos, em grande quantidade e que possuem acesso fácil aos gametas masculinos, uma alternativa seria a transferência gênica mediada por espermatozóides (TGME).

A TGME já foi realizada com sucesso em mamíferos [7-9], aves [10], anfíbios [11] e alguns invertebrados [12,13]. Em peixes, o uso de espermatozóides como vetores de DNA tem sido empregado com sucesso quando o sêmen é eletroporado. Isso já foi demonstrado para tilápia *Oreochromis niloticus* [14], “zebrafish” *Danio rerio* [15] salmão *Oncorhynchus tshawytscha* [16], carpa capim *Ctenopharyngodon idellus* [17] e “silver sea bream” *Sparus sarba* [3]. Entretanto, quando o sêmen foi diretamente incubado com o DNA exógeno essa metodologia falhou ou produziu baixas taxas de peixes transgênicos [17-20]. Somente Khoo *et al.* [21] trabalhando com o sêmen de “zebrafish” conseguiram produzir elevadas taxas de peixes transgênicos através do contato direto do sêmen com o DNA exógeno.

As dificuldades encontradas na tentativa de produzir peixes transgênicos utilizando a TGME se devem aos poucos estudos realizados em peixes para avaliar os processos que regulam a interação entre DNA exógeno e espermatozóides. O contrário ocorre em mamíferos, onde os processos que regem essa interação já são mais conhecidos. Já foi observado que proteínas de 30-35 kDa interagem positivamente com o DNA permitindo a sua internalização para o núcleo [22]. Por outro lado, também existem moléculas que atuam como reguladoras negativas dessa interação como o Fator Inibitório 1 (IF-1) e a enzima DNase que geralmente são encontrados no plasma seminal de mamíferos [22,23]. Além desses fatores, a qualidade do sêmen utilizado para

incorporação do DNA exógeno, a origem do sêmen (ejaculado ou do epidídimo), o tempo de exposição do DNA ao sêmen, a temperatura de incubação, a quantidade de DNA utilizado no contato com os espermatozóides e a arquitetura do plasmídeo são fatores que também interferem na interação do sêmen com o DNA exógeno [9,24,25].

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade da enzima DNase e outros fatores limitantes na incorporação do DNA exógeno pelas células espermáticas e usar essas informações para desenvolver um protocolo de incorporação de DNA exógeno para os espermatozóides do linguado *P. orbignyana*.

2. Material e Métodos

2.1 Peixes e coleta do sêmen

Os linguados utilizados nesse estudo foram capturados na praia do Cassino (Rio Grande-Brasil, 32° 12' S - 52° 10' O) e encaminhados para a Estação Marinha de Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O sêmen foi coletado de linguados sexualmente maduros com peso de 479 ± 83 g (média \pm erro padrão) e comprimento total de 34 ± 2 cm.

Para a coleta do sêmen os linguados foram anestesiados com benzocaína (50 ppm). Em seguida, seu abdômen foi seco e limpo com papel toalha. Durante a coleta, foram tomados cuidados para evitar a contaminação do sêmen com urina, sangue e/ou fezes. O sêmen foi coletado utilizando seringas descartáveis graduadas sem agulha (1 mL) através de extrusão manual e imediatamente transferido para microtubos de 1,5 mL. Para a coleta do sêmen diretamente dos testículos os animais foram sacrificados e dissecados. Os testículos foram lavados com água destilada, secados e o sêmen foi coletado com seringas descartáveis. Como foi coletado pouco sêmen, os testículos foram macerados no interior de microtubos de 1,5 mL para obtenção de um maior volume.

2.2 DNA exógeno

O DNA exógeno utilizado neste estudo foi o transgene pKeratin-GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Takashi Aoki, Tokyo University of Marine Science and Technology, Japão), constituído do promotor da queratina do linguado *Paralichthys*

olivaceus associado ao gene da proteína verde fluorescente (GFP) da medusa *Aequorea victoria* [5]. O gene da GFP foi utilizado para identificação do sêmen transgênico através de PCR, já que esse gene não está presente no genoma do linguado *P. orbignyana*. Em todos os experimentos o transgene foi utilizado na forma circular.

2.3. Experimento 1: detecção da atividade da enzima DNase no plasma seminal

O sêmen coletado foi imediatamente centrifugado a $12000 \times g$ por 20 min e o plasma seminal foi retirado e acondicionado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser utilizado. Para avaliar se há atividade da enzima DNase no plasma seminal do linguado, $1\text{ }\mu\text{L}$ do pKeratin-GFP ($400\text{ ng}/\mu\text{L}$) foi adicionado a $7\text{ }\mu\text{L}$ de plasma. As reações foram incubadas por 50 min a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura foi utilizada, pois de acordo com Radonic *et al.* [26] foi a que resultou nos melhores resultados na obtenção de desovas naturais em cativeiro. Após, as reações foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1 % contendo brometo de etídeo ($0,5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em transluminador de ultravioleta. Foram analisados os plasmas seminais do sêmen ejaculado ($n = 3$), do sêmen retirado do testículo ($n = 3$) e o obtido dos testículos macerados ($n = 3$). Para quantificar o grau de degradação do DNA exógeno, uma análise de fluorescência foi feita utilizando o aparelho Qubit (Invitrogen, Califórnia; USA) com o kit Quant-iT dsDNA BR. Este método permite que o transgene que não foi degradado seja quantificado. Para isso, $1\text{ }\mu\text{L}$ de cada reação foi utilizada conforme o protocolo descrito pelo fabricante.

2.4. Experimento 2: avaliação da atividade da enzima DNase em diferentes condições

Para determinar o tempo que a enzima DNase demora para degradar uma concentração determinada de DNA exógeno, diferentes tempos de incubação foram testados. O plasma seminal do sêmen ejaculado de três animais foi agrupado. Foram utilizados $7\text{ }\mu\text{L}$ de plasma e $1\text{ }\mu\text{L}$ do pKeratin-GFP ($400\text{ ng}/\mu\text{L}$). As reações foram incubadas por 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. No tempo 0, o transgene foi adicionado somente no momento que a eletroforese foi realizada. Após, as reações foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1 % contendo brometo de etídeo ($0,5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em transluminador de ultravioleta. A quantificação do grau de degradação do DNA exógeno nos diferentes tempos foi determinada utilizando o aparelho Qubit conforme descrito anteriormente.

Para avaliar a temperatura ótima de atividade da enzima DNase, diferentes temperaturas foram testadas. O plasma seminal do sêmen ejaculado de três animais foi agrupado. Para observar melhor a diferença entre cada temperatura o plasma seminal foi diluído 1:1 (v/v) em água destilada. Foram utilizados 7 μL de plasma diluído e 1 μL do pKeratin-GFP (400 $\text{ng}/\mu\text{L}$). As reações foram incubadas por 30 min nas seguintes temperaturas: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 e 64 °C. Após, as reações foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1 % contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em transluminador de ultravioleta. A quantificação do grau de degradação do DNA exógeno de cada reação foi determinada utilizando o aparelho Qubit conforme descrito anteriormente.

Diferentes concentrações de plasma seminal foram incubadas com o transgene pKeratin-GFP para produzir uma curva de concentração para determinar a atividade da enzima DNase. O plasma seminal foi diluído 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20 (v/v) em água destilada. Para cada reação, foram utilizados 2 μL do pKeratin-GFP (200 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e 1 μL de cada diluição. Três outras reações foram compostas de 10, 5 e 1 μL de plasma seminal sem ser diluído junto com 2 μL do pKeratin-GFP (200 $\text{ng}/\mu\text{L}$). As reações foram incubadas por 15 min a 32 °C. Após, as reações foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1 % contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em transluminador de ultravioleta. A quantificação do grau de degradação do DNA exógeno de cada reação foi determinada utilizando o aparelho Qubit conforme descrito anteriormente.

2.5. Experimento 3: avaliação do efeito do EDTA na atividade da enzima DNase

Para verificar se a atividade da enzima DNase é inibida pelo EDTA, diferentes concentrações foram testadas. O plasma seminal do sêmen ejaculado de três animais foi agrupado. Para as reações foram utilizados 3 μL de plasma, 1 μL do pKeratin-GFP (400 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e 3 μL de EDTA nas concentrações de 5, 25, 50, 75, 100, 250 e 500mM. A concentração final de EDTA em cada reação foi de aproximadamente 2, 10, 20, 30, 40, 105 e 215mM, respectivamente. As reações foram incubadas por 30 min a 32°C. Após, as reações foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1 % contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizadas em transluminador de ultravioleta. Para

verificar se o transgene continuou íntegro nas diferentes reações o aparelho Qubit foi utilizado para quantificação conforme descrito anteriormente.

2.6. Experimento 4: avaliação da concentração de DNA ideal para utilização na TGME

Após o sêmen ser coletado ($n = 3$), 50 μL foi fixado em formalina 4% e diluído em água destilada (1:2000). A concentração de espermatozóides foi determinada usando uma câmara de Neubauer espelhada. Após a estimativa da concentração, as amostras de sêmen foram diluídas para uma concentração final de 10^6 espermatozóides/ μL utilizando 50 mM de EDTA. Para avaliar a concentração ideal de DNA a ser utilizada na TGME, três concentrações de DNA foram testadas. Para a realização das reações, 5 μL de sêmen (10^6 células/ μL) foram incubados com 5 μL de pKeratin-GFP (50, 100 e 500 ng/ μL) durante 50 min a temperatura ambiente. Amostras com apenas 5 μL de sêmen (10^6 células/ μL) foram utilizadas como controle. Após esse período, 2 μL de cada reação foram ativadas com 8 μL de água salgada (35%) para estimar o percentual de células móveis. A motilidade dos espermatozóides foi estimada em microscópio óptico (Olympus CX-41, USA) sob o aumento de 400 \times usando uma escala arbitrária, na qual 0 representa 0%, 1 \cong 1-25%, 2 \cong 26-50%, 3 \cong 51-75%, 4 \cong 76-90% e 5 \cong 91-100% de espermatozóides móveis [27].

2.7. Experimento 5: incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides

Após o sêmen ser coletado, esse foi ativado com água salgada através de uma diluição 1:50 (1 μL de sêmen e 49 μL de água salgada) e a motilidade foi avaliada conforme descrito anteriormente. Somente as amostras com motilidade superior a 50% (≥ 3), após ativação com água salgada, foram utilizadas. Foram testadas três soluções (Tabela 1) para lavar o sêmen do linguado. Para lavar o sêmen, 50 μL de solução de lavagem foram misturados a 50 μL de sêmen. As reações foram centrifugadas a 3000 RPM por 3 min a 15 °C. O sobrenadante foi retirado sem perturbar as células. O sêmen foi misturado novamente com a mesma quantidade de solução de lavagem e centrifugado a 3000 RPM por 3 min a 15 °C. Esse procedimento foi repetido três vezes e após a terceira lavagem, a densidade de células foi estimada conforme descrito anteriormente.

Para avaliar a incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides foram utilizadas duas concentrações do pKeratin-GFP (10 e 50 ng/μL) para cada 10⁶ células/μL. As reações foram incubadas por 50 min a temperatura ambiente e, posteriormente, a motilidade dos espermatozóides foi avaliada. Amostras de 10 μL de sêmen sem presença de DNA foram utilizadas como controle.

Para degradar todo o DNA exógeno que não foi incorporado pelos espermatozóides todas as reações foram tratadas com 0.1 mg de DNase I por 30 min a 37 °C, seguido de duas lavagens nas respectivas soluções utilizadas no início do protocolo, conforme descrito anteriormente.

Para confirmar a presença do gene da GFP nos espermatozóides, o DNA foi extraído usando o método de fenol/clorofórmio como descrito por Sambrook *et al.* [28]. O DNA extraído de cada tratamento foi usado como molde para a realização de uma PCR (reação em cadeia da polimerase). Para amplificação do gene da GFP foi utilizado os primers específicos eGFP-For (5' – AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG–3') e eGFP-Rev (5' – TGATATAGACGTTGTGGCTGTTG–3'). As condições de amplificação foram constituídas de um passo de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido de 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e um passo final de alongação a 72 °C por 5 min. Após a amplificação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo (0,5 μg/mL) e visualizadas em transluminador de ultravioleta.

2.8. Análises estatísticas

Para avaliar se houve diferenças significativas no percentual de células móveis entre as diferentes concentrações de DNA utilizado no experimento 4, assim como, nos diferentes tratamentos do experimento 5, a análise de variância (ANOVA) foi utilizada. Quando as diferenças foram significativas, o teste de múltiplas comparações Tukey HSD foi utilizado para comparação. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Todas as análises foram realizadas usando o software R versão 2.4.0 (Viena, Áustria).

3. Resultados

3.1. Experimento 1: detecção da atividade da enzima DNase no plasma seminal

Todas os plasmas seminais testados, independente da origem, mostraram uma alta atividade da enzima DNase, entretanto as amostras de plasma seminal do sêmen ejaculado mostraram uma atividade menor do que as oriundas do testículo (Fig. 1).

3.2. Experimento 2: avaliação da atividade da enzima DNase em diferentes condições

No experimento de diferentes tempos de incubação foi verificado que a enzima DNase atua de uma forma muito rápida, já que no tempo 0 o DNA exógeno foi degradado (Fig. 2a). Entre os tempos de 15 a 60 min a atividade da enzima não se alterou muito, como foi observado através dos dados obtidos pelo Qubit (Fig. 2b). Nos tempos de 90 e 120 min o pKeratin-GFP foi totalmente degradado.

Quando o plasma seminal foi incubado com o transgene em diferentes temperaturas foi verificado que a enzima atua em uma ampla faixa, já que houve atividade da enzima entre as temperaturas de 8 a 56 °C. Porém, a temperatura ótima de atividade foi definida em 32°C através dos dados do Qubit (Fig. 3b). Na temperatura de 64 °C praticamente não houve degradação do transgene (Fig. 3a).

Quando o plasma seminal foi diluído a degradação do pKeratin-GFP diminuiu bastante, principalmente, a partir da diluição 1:5 (plasma:água destilada). Nas reações em que o plasma seminal não foi diluído o DNA exógeno foi totalmente degradado (Fig. 4a,b).

3.3. Experimento 3: avaliação do efeito do EDTA na atividade da enzima DNase

Quando diferentes concentrações de EDTA foram adicionadas nas reações contendo o plasma seminal, uma diminuição da atividade da enzima DNase foi observada (Fig. 5a,b). Nas concentrações mais baixas (2 e 10mM de EDTA) a enzima conseguiu degradar o DNA exógeno. Nas concentrações de 20 e 30mM de EDTA a degradação do plasmídeo foi reduzida, entretanto, ainda houve atividade de DNases. Porém, a partir da concentração de 40mM praticamente não houve mais degradação do DNA exógeno.

3.4. Experimento 4: avaliação da concentração de DNA ideal para utilização na TGME

Através desse experimento foi verificado que a concentração ideal de DNA a ser utilizado na TGME é 50 ng/μL para cada 10⁶ espermatozoides/μL, já que não houve

diferença significativa no percentual de células móveis entre essa concentração ($2,5 \pm 0,08$) e o controle ($2,6 \pm 0,28$) ($P > 0,05$). Na concentração de $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ foi observada uma motilidade reduzida ($1,0 \pm 0,05$) em relação ao controle e a concentração de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($P < 0,05$). A concentração de $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$ foi letal para as células já que não houve espermatozóides móveis (Fig. 6).

3.5. Experimento 5: incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides

Após o contato do DNA exógeno com os espermatozóides, a motilidade do sêmen de todos os tratamentos foi avaliada. Quando o sêmen foi incubado com $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA exógeno, todas as amostras apresentaram o mesmo percentual de células móveis, independente da solução de lavagem utilizada ($P > 0,05$; Fig. 7a). Entretanto, quando o sêmen foi incubado com $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA exógeno, a maior motilidade foi observada no sêmen que foi lavado com a solução I ($2,5 \pm 0,28$) ($P < 0,05$). A menor motilidade foi verificada no tratamento com a solução III ($1,06 \pm 0,06$) ($P < 0,05$; Fig. 7b).

Através da PCR foi verificado que o sêmen do linguado *P. orbignyianus* é capaz de incorporar o DNA exógeno. Todas as soluções de lavagem, assim como, as diferentes concentrações de DNA exógeno (10 e $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) usadas permitiram que o pKeratin-GFP fosse internalizado pelos espermatozóides (Fig. 8).

4. Discussão

Neste estudo foi verificada uma forte atividade de DNase no plasma seminal do linguado *P. orbignyianus*. Para nosso conhecimento essa é a primeira vez que é descrita atividade de DNase no plasma seminal de peixes. Essa observação é interessante e pode explicar porque vários trabalhos não conseguiram produzir peixes transgênicos incubando diretamente o sêmen com o DNA exógeno. De acordo com Carballada & Esponda [23] essa enzima é a principal responsável pela inibição da interação dos espermatozóides com o DNA exógeno nos mamíferos. Em peixes, a TGME tem sido aplicada com sucesso quando os espermatozóides são eletroporados. Isto pode ser explicado por dois fatores. Primeiro, a eletroporação facilita a entrada do DNA exógeno

para as células espermáticas devido à abertura de pequenos poros induzido pelo campo elétrico. Segundo, essa metodologia não exige que o DNA exógeno fique em contato por muito tempo com o sêmen. Assim, isso evitaria que todo o DNA fosse degradado por DNases que pudessem estar presentes no plasma seminal das espécies que foram usadas nos experimentos de transgenia. Somente Khoo *et al.* [21] conseguiram elevadas taxas de “zebrafish” transgênicos incubando diretamente o sêmen com o DNA exógeno. Entretanto, antes da incubação o sêmen foi lavado mais de uma vez com PBS. Este fato demonstra que as células espermáticas de peixes precisam ser tratadas antes da incubação com DNA exógeno para eliminar qualquer tipo de interferente negativo para facilitar a incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides.

A presença da atividade de DNases já foi observada no fluido da vesícula seminal e no sêmen ejaculado de mamíferos [23,29], em diferentes órgãos do sistema reprodutivo de coelhos [30] e no sêmen ejaculado de galos [31]. No presente estudo foi verificado que tanto o sêmen ejaculado como o obtido diretamente dos testículos possuem uma forte atividade de DNases. Além disso, foi verificado que a atividade da DNase pode ser completamente inibida pela presença de EDTA no meio a partir da concentração de 40mM. Para o sêmen de ratos e galos uma concentração de 50mM de EDTA também foi capaz de diminuir a atividade de DNases presentes no plasma seminal [23,31]. O EDTA é um quelante orgânico, na qual impede que íons divalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} fiquem livres na reação. Essa informação sugere que a enzima encontrada no plasma seminal do linguado *P. orbignyanus* é a DNase I, já que ela é dependente de íons divalentes para conseguir exercer sua atividade. Anteriormente, Yamamoto [32] havia observado atividade de DNase II nos testículos do salmão *Oncorhynchus tshawytscha* e Nechaevsky *et al.* [33] havia encontrado a mesma enzima nos espermatozóides do “loach” *Misgurnus fossilis*. Entretanto, a enzima DNase II é ativa somente em pH ácido e na ausência de cátions divalentes. Assim, essa enzima não parece interferir na interação dos espermatozóides com o DNA exógeno em peixes. Também foi observado que a temperatura ótima de atividade da enzima DNase é 32 °C e em temperaturas superiores a 56°C a sua atividade diminui, provavelmente devido a desnaturação da enzima.

A quantidade de DNA a ser utilizado na TGME é outro fator limitante para produzir animais transgênicos. Embora, concentrações elevadas de DNA exógeno

umentem a possibilidade de incorporação pelas células, já foi verificado que a motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozóides fica reduzida [7,34,35]. Maione *et al.* [36] também observaram que concentrações elevadas (100 – 500 ng/10⁶ células) ativam endonucleases que podem degradar as moléculas de DNA exógeno e, em condições extremas, podem degradar até mesmo o DNA genômico, levando à célula a morte num processo semelhante a apoptose. No presente estudo processos semelhantes a esses foram observados com o sêmen do linguado *P. orbignyanus*. Na concentração de 100 ng/10⁶ células foi observada uma diminuição da motilidade. Por sua vez, na maior concentração (500 ng/10⁶ células) não foram observados espermatozóides móveis, indicando que as células possam ter sofrido um processo de apoptose semelhante ao que foi descrito por Maione *et al.* [36] para as células espermáticas de ratos. Somente a menor concentração (50 ng/10⁶ células) não afetou a motilidade do sêmen. De acordo com Rurangwa *et al.* [37] a motilidade do sêmen esta diretamente relacionada à capacidade de fertilização dos espermatozóides e é o principal parâmetro relacionado à qualidade do sêmen em peixes. Dessa forma, uma quantidade similar ou inferior a 50 ng/10⁶ células deve ser usada na TGME para o linguado *P. orbignyanus*.

Para o desenvolvimento do protocolo de incorporação do DNA exógeno pelos espermatozóides do linguado *P. orbignyanus* três pontos foram considerados fundamentais: *i)* eliminar a atividade de DNase presente no plasma seminal; *ii)* obter uma solução de lavagem que mantivesse o sêmen íntegro e *iii)* utilizar uma concentração de DNA que não prejudicasse a motilidade dos espermatozóides e, ao mesmo tempo, permitisse que as células conseguissem incorporar o DNA exógeno. Os experimentos realizados, anteriormente, forneceram subsídios para o desenvolvimento do protocolo. Primeiro, a atividade da enzima DNase foi reduzida pela adição de EDTA em todas as soluções de lavagem testadas (Tabela 1). Além disso, a realização da lavagem do sêmen três vezes antes da incubação com o DNA exógeno auxiliou nesse processo. Segundo, todas as soluções testadas foram eficazes tanto na lavagem do sêmen quanto na preservação da motilidade dos espermatozóides, principalmente quando o sêmen foi incubado com 10 ng/μL. Quando o sêmen foi incubado com 50 ng/μL, as soluções I e II forneceram os melhores resultados relacionados a motilidade. Esse resultado pode estar relacionado com a presença de CaCl₂ nessas soluções. Alavi &

Cosson [38] sugerem que a motilidade do sêmen de alguns peixes marinhos é regulada tanto pela pressão osmótica quanto pela presença do íon Ca^{2+} , que permite que a motilidade ocorra em altas pressões osmóticas. Terceiro, as concentrações de DNA (10-50 ng/ μL) utilizadas são adequadas para fazer com que os espermatozoides incorporem o DNA exógeno.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os sêmen de peixes é capaz de incorporar o DNA exógeno após ser tratado para eliminar a atividade da DNase presente no plasma seminal. Além disso, o protocolo desenvolvido neste estudo abre uma perspectiva interessante na produção de peixes transgênicos através da TGME e, conseqüentemente no melhoramento genético de espécies marinhas como o linguado *P. orbignyanus*.

Agradecimentos

C.F.C Lanes é estudante do curso de Pós-Graduação em Aqüicultura da FURG e possui uma bolsa de estudos do CNPq. L.A. Sampaio é bolsista de produtividade do CNPq (Processo 301673/2006-3).

Bibliografia

- [1] Ozato K, Kondoh H, Inohara H, Iwamatsu T, Wakamatsu Y, Okada, TS. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differen* 1986;19:237-244.
- [2] Inoue K, Yamashita S, Hata J-I, Kabeno S, Asada S, Nagahisa E. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Diff Dev* 1990;29:123–128.
- [3] Lu JK, Fu BH, Wu JL, Chen TT. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar Biotechnol* 2002;4:328-337.
- [4] Lin S, Gaiano N, Culp P, Burns JC, Friedmann T, Yee JK. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 1994;265:666–669.

- [5] Yazawa R, Hirono I, Yamamoto E, Aoki T. Gene transfer for Japanese flounder fertilized eggs by particle gun bombardment. *Fisheries Science* 2005;71:869–874.
- [6] Hostetler HA, Peck SL, Muir WM. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Res* 2003;12:413–424.
- [7] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs – genetic transformation of mice. *Cell* 1989;57:717-723.
- [8] Sperandio S, Lulli V, Bacci ML, Forni M, Maione B, Spadafora C, Lavitrano ML. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim Biotechnol* 1996;7:59-77.
- [9] Hoelker M, Mekchay S, Schneider H, Bracket B, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Gilles, M, Rings F, Griese J. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: Effect of transfection reagent and DNA architecture. *Theriogenology* 2007;67:1097-1107.
- [10] Nakanishi A, Iritani A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol Reprod Dev* 1993;36:258–261.
- [11] Habrova V, Takac M, Navratil J, Macha J, Ceskova N, Jonak J. Association of Rous sarcoma virus DNA with *Xenopus laevis* spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Mol Reprod Dev* 1996;44:32-42.
- [12] Arezzo F. Sea-urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biol Int Rep* 1989;13:391-404.
- [13] Atkinson PW, Hines ER, Beaton S, Matthaei KI, Reed KC, Bradley MP. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod Dev* 1991;29:1-5.
- [14] Muller F, Ivies Z, Erdelyi F, Papp T, Varadi L, Horvath L, Maclean N. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol Mar Biol Biotech* 1992;1:276-281.
- [15] Patil JG, Khoo HW. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J Exp Zool* 1996;274:121-129.

- [16] Sin FYT, Walker SP, Sin IL, Symonds JE, Mukherjee UK, Khoo JGI. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: Efficiency, reliability, and fate of transgene. *Mol Reprod Dev* 2000;56:285-288.
- [17] Zhong JY, Wabg YP, Zhu ZY. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. *Aquaculture* 2002;214:93-101.
- [18] Chourrout D, Perrot E. No transgenic rainbow trout produced with sperm incubated with sperm linear DNA. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1992;1:282-285.
- [19] Sin FYT, Bartley AL, Walker SP, Sin IL, Symonds JE, Hawke L, Hopkins CL. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture* 1993;117:57-69.
- [20] Liu XY, Zohar Y, Knibb W. Association of foreign DNA with sperm of gilthead seabream, *Sparus aurata*, after sonification, freezing and dimethyl sulfoxide treatments. *Mar Biotechnol* 1999;1:175-183.
- [21] Khoo HW, Ang LH, Lim HB, Wong KY. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture* 1992;10:1-19.
- [22] Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S, Spadafora C. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells - factors controlling the DNA uptake. *Exp Cell Res* 1995;217:57-64.
- [23] Carballada R, Esponda P. Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. *Exp Cell Res* 2001;262:104-113.
- [24] Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev* 2003;64:284-291.
- [25] Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A. Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev* 2006;18:19-23.
- [26] Radonic M, Müller MI, López AV, Bambill GA, Spinedi M, Boccanfuso JJ,. Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina. *Cienc Mar* 2007; 33:187-196.
- [27] Borges A, Siqueira DR, Jurinitz DF, Zanini R, Amaral F, Grillo ML, Oberst ER, Wassermann GF. Biochemical composition of seminal plasma and annual

- variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiol Biochem* 2005;31:45-53.
- [28] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [29] Tanigawa Y, Yoshihara K, Koide SS. Endonuclease activity in bull semen, testis and accessory sex organs. *Biol Reprod* 1975;12:464-470.
- [30] Takeshita H, Yasuda T, Nadano D, Tenjo E, Sawazaki K, Iida R, Kishi K. Detection of deoxyribonucleases I and II (DNases I and II) activities in reproductive organs of male rabbits. *Int J Biochem* 1994;26:1025-1031.
- [31] Sato F, Soh T, Hattori M-a, Fujihara N. Evaluation of deoxyribonuclease activity in seminal plasma of ejaculated chicken semen. *Asian J Androl* 2003;5:213-216.
- [32] Yamamoto M. Purification and some properties of an acid deoxyribonuclease from testes of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971;228:95-104.
- [33] Nechaevsky YV, Ivanov VA. DNase II in spermatozoa of the Loach *Misgurnus fossilis* L. *Biochemistry* 1999;64:488-493.
- [34] Sasaki S, Kojima Y, Kubota H, Tatsura H, Hayashi Y, Kohri K. Effects of the gene transfer into sperm mediated by liposomes on sperm motility and fertilization in vitro. *Hinyokika Kyo* 2000;29:6-15.
- [35] Anzar M, Buhr MM. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology* 2006;65:683-690.
- [36] Maione B, Pittogi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* 1997;16:1087-1097.
- [37] Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 2004;234:1-28.
- [38] Alavi SM, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biol Int* 2006;30:1-14.
- [39] Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, Power J. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 2001;194, 191-200.

[40] Dreanno C, Suquet M, Desbruyères E, Cosson J, Delliou HL, Billard R. Effect of urine on semen quality in turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture* 1998;169,247-262.

Tabela 1: Soluções utilizadas para lavar o sêmen do linguado *P. orbignyanus*.

Compostos	Solução I*	Solução II**	Solução III***
Sacarose (mM)	150	-	-
CaCl₂ (mM)	1,7	2,7	-
MgSO₄ (mM)	7	-	-
Glicina (mM)	86	-	-
Trizma (mM)	30	-	53,7
NaCl (mM)	-	70	-
KCl (mM)	-	1,5	-
MgCl₂ (mM)	-	6,1	-
Glicose (mM)	-	0,4	62,5
NaHCO₃ (mM)	-	25	-
Ácido Cítrico (H₂O)	-	-	16,9
Citrato de Sódio (2H₂O)	-	-	34
EDTA (mM)	25	25	12,7

* Solução modificada de Tvedt *et al.* [39].

** Solução modificada de Dreanno *et al.* [40].

*** Solução modificada de Lavitrano *et al.* [24].

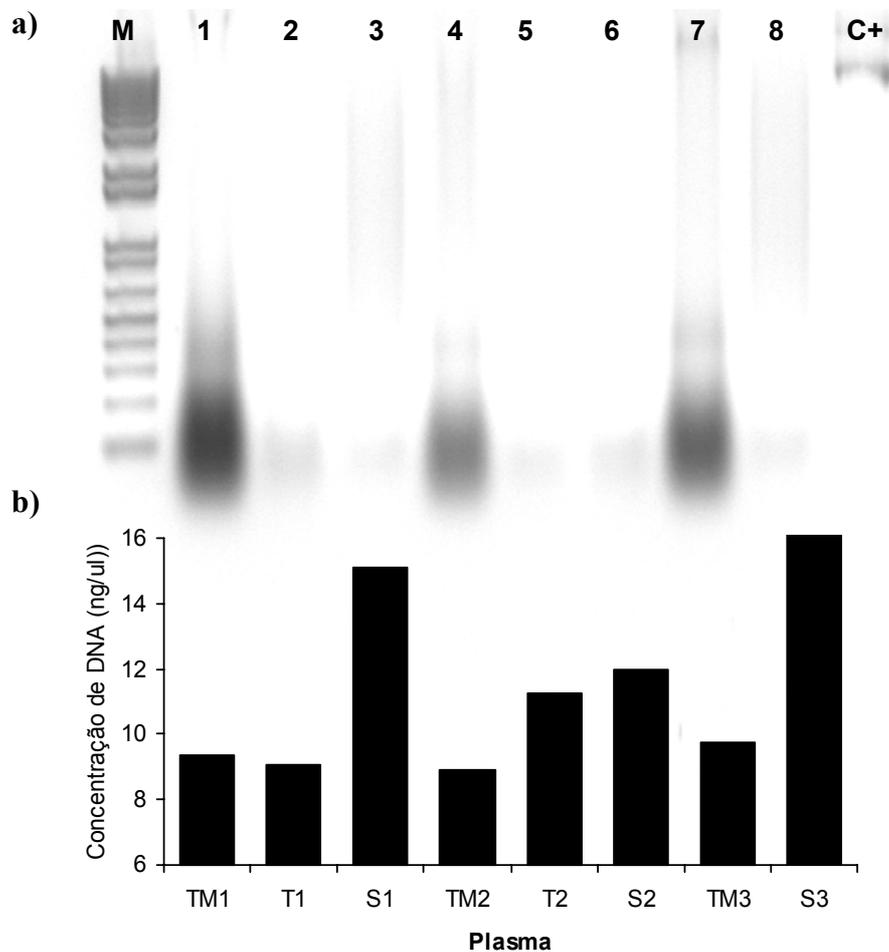


Fig. 1. Atividade da enzima DNase no plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyanus*. (a) Determinação da atividade da enzima DNase através de eletroforese em gel de agarose. M, marcador molecular 1KB plus; Colunas 1, 2 e 3, plasma seminal dos testículos macerados (TM₁), do sêmen dos testículos (T₁) e do sêmen ejaculado (S₁) do indivíduo 1; Colunas 4, 5 e 6, plasma seminal dos testículos macerados (TM₂), do sêmen dos testículos (T₂) e do sêmen ejaculado (S₂) do indivíduo 2; Colunas 7 e 8, plasma seminal dos testículos macerados (TM₃) e do sêmen ejaculado (S₃) do indivíduo 3; C+, pKeratin-GFP (400 ng/μL). (b) Concentração do pKeratin-GFP (ng/μL) determinado pelo Qubit utilizando plasmas de diferentes origens.

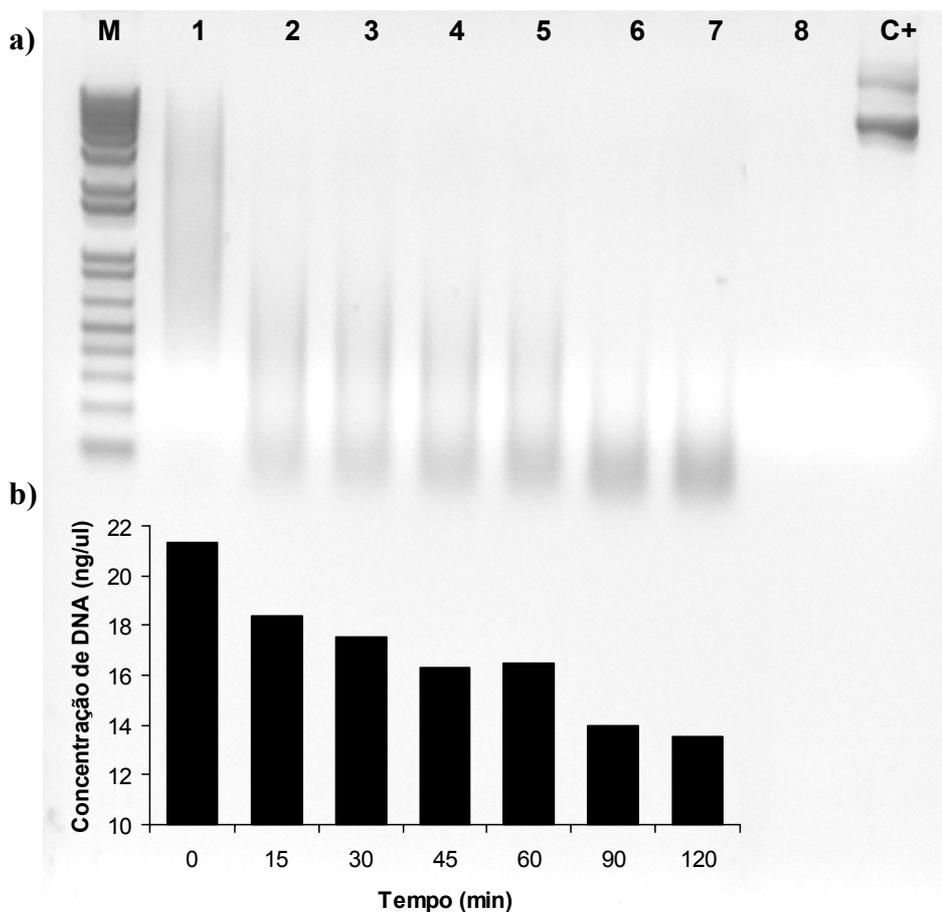


Fig. 2. Avaliação da atividade da enzima DNase presente no plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyanus* incubada a 20 °C ao longo de diferentes tempos. (a) Determinação da atividade da enzima DNase através de eletroforese em gel de agarose. M, marcador molecular 1KB plus; Coluna 1, reação incubada durante 0 min; Coluna 2, reação incubada durante 15 min; Coluna 3, reação incubada durante 30 min; Coluna 4, reação incubada durante 45 min; Coluna 5, reação incubada durante 60 min; Coluna 6, reação incubada durante 90 min; Coluna 7, reação incubada durante 120 min; Coluna 8, somente plasma seminal; C+, pKeratin-GFP (400 ng/μL); (b) Concentração do pKeratin-GFP (ng/μL) determinado pelo Qubit após os diferentes tempos de incubação.

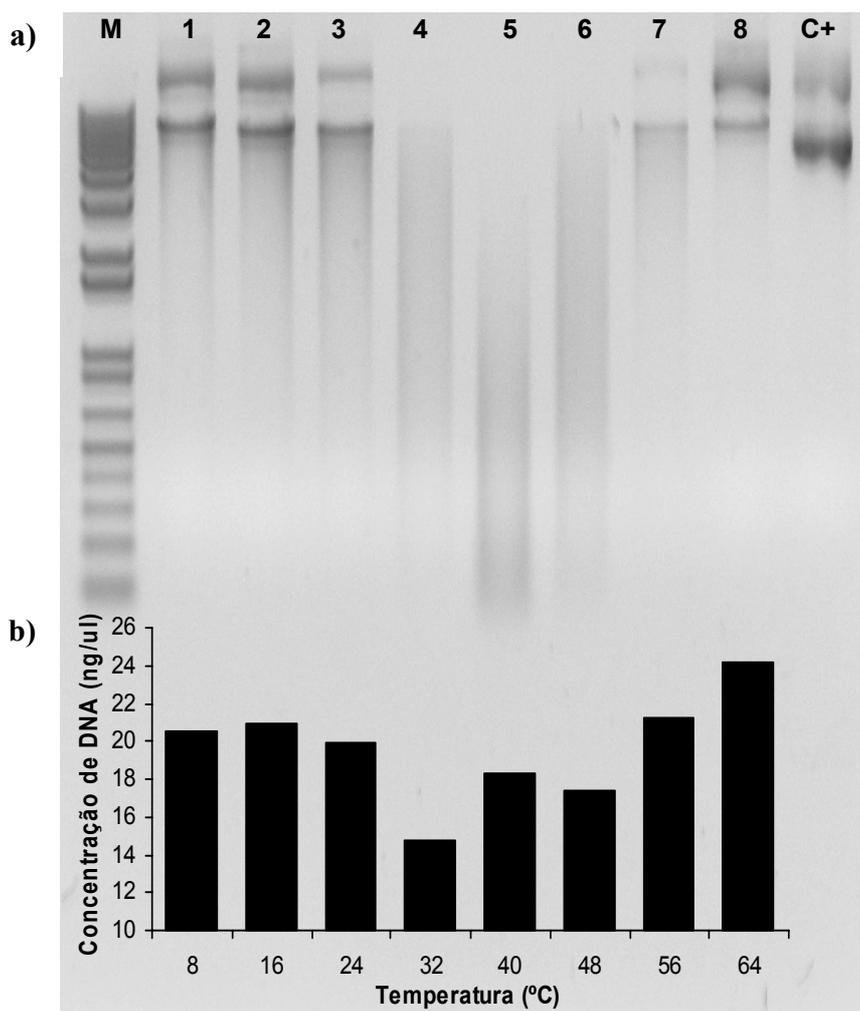


Fig. 3. Avaliação da atividade da enzima DNase presente no plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyanus* após diferentes temperaturas de incubação. (a) Atividade da enzima DNase através de eletroforese em gel de agarose. M, marcador molecular 1KB plus; Coluna 1, reação incubada a 8 °C; Coluna 2, reação incubada a 16 °C; Coluna 3, reação incubada a 24 °C; Coluna 4, reação incubada a 32 °C; Coluna 5, reação incubada a 40 °C; Coluna 6, reação incubada a 48 °C; Coluna 7, reação incubada a 56 °C; Coluna 8, reação incubada a 64 °C; C+, pKeratin-GFP (400 ng/μL); (b) Concentração do pKeratin-GFP (ng/μL) determinado pelo Qubit após diferentes temperaturas de incubação.

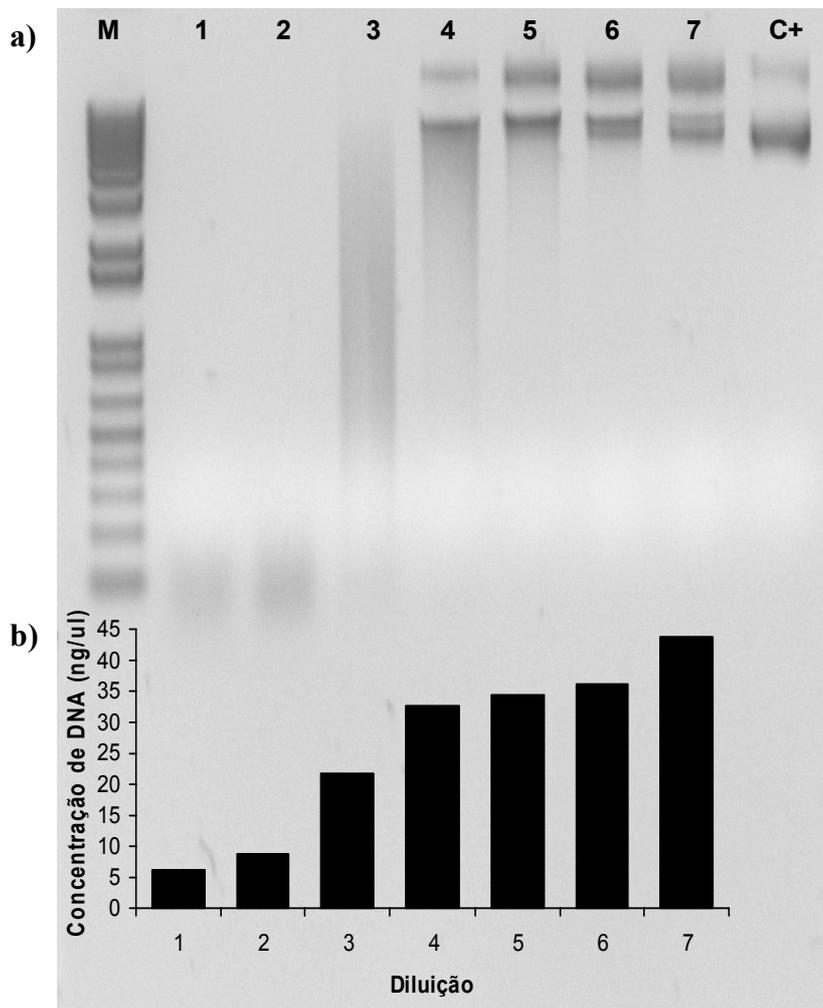


Fig. 4. Avaliação da atividade da enzima DNase utilizando diferentes diluições do plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyanus*. (a) Avaliação da atividade da enzima DNase através de eletroforese em gel de agarose. M, marcador molecular 1KB plus; Coluna 1, 10 μ L de plasma seminal; Coluna 2, 5 μ L de plasma seminal; Coluna 3, 1 μ L de plasma seminal; Coluna 4, 1 μ L da diluição 1:1; Coluna 5, 1 μ L da diluição 1:5; Coluna 6, 1 μ L da diluição 1:10; Coluna 7, 1 μ L da diluição 1:20; C+, pKeratin-GFP (400 ng/ μ L); (b) Concentração do pKeratin-GFP (ng/ μ L) determinado pelo Qubit utilizando diferentes diluições de plasma seminal.

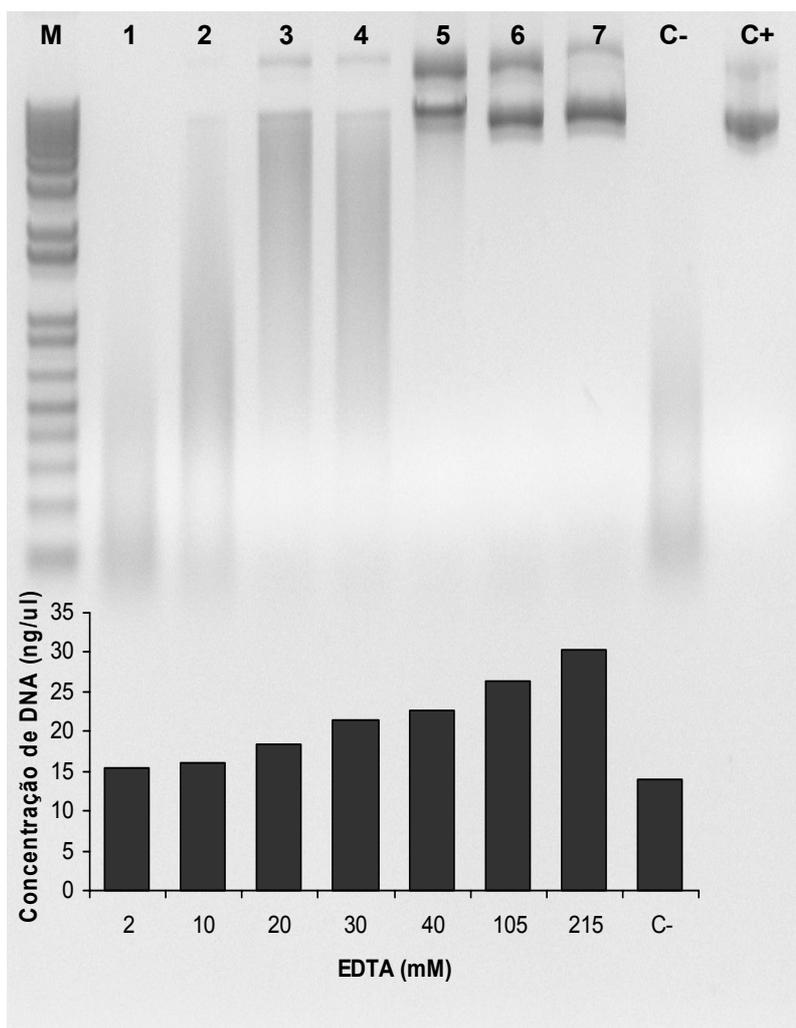


Fig. 5. Efeito das diferentes concentrações de EDTA sobre a atividade da enzima DNase encontrada no plasma seminal do linguado *Paralichthys orbignyanus*. (a) Avaliação da atividade da enzima DNase através de eletroforese em gel de agarose. M, marcador molecular 1KB plus; Coluna 1, 2mM de EDTA; Coluna 2, 10mM de EDTA; Coluna 3, 20mM de EDTA; Coluna 4, 30mM de EDTA; Coluna 5, 40mM de EDTA; Coluna 6, 105mM de EDTA; Coluna 7, 215mM de EDTA; C-, plasma seminal + pKeratin-GFP sem EDTA; C+, pKeratin-GFP (400 ng/μL); (b) Concentração do pKeratin-GFP (ng/μL) determinado pelo Qubit após o plasma seminal ser tratado com diferentes concentrações de EDTA.

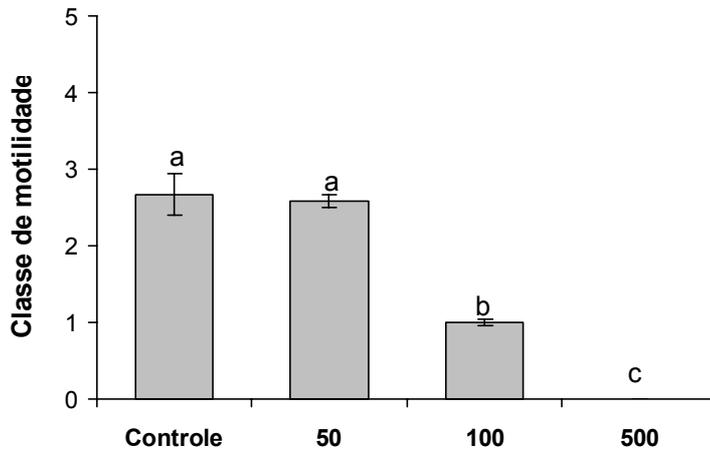


Fig. 6. Motilidade do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* ($n=3$) após ser incubado com diferentes concentrações do pKeratin-GFP (50, 100, 500 ng/ μ L) para cada 10^6 espermatozoides/ μ L. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os dados estão representados como média \pm erro padrão. Controle = sêmen fresco sem ter sido incubado com DNA exógeno.

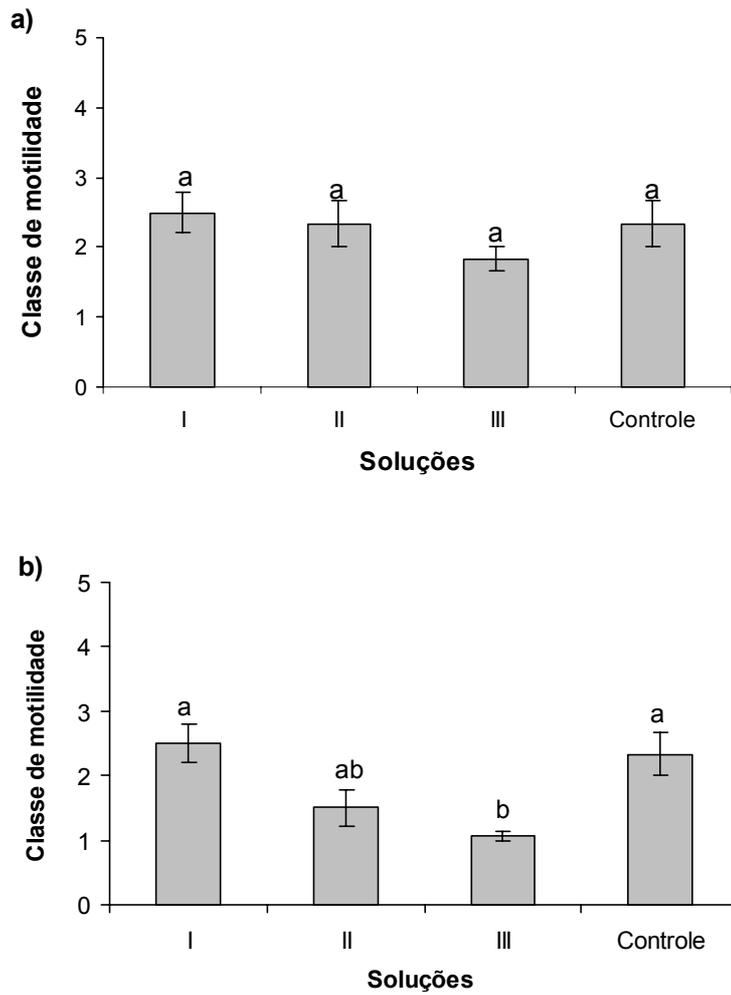


Fig. 7. Motilidade do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* ($n=3$) após ser lavado e incubado com DNA exógeno. (a) Sêmen incubado com 10 ng/ μ L de pKerati-GFP para cada 10^6 espermatozoides/ μ L. (b) Sêmen incubado com 50 ng/ μ L de pKerati-GFP para cada 10^6 espermatozoides/ μ L. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os dados estão representados como média \pm erro padrão. Controle = sêmen fresco sem ter sido incubado com DNA exógeno.

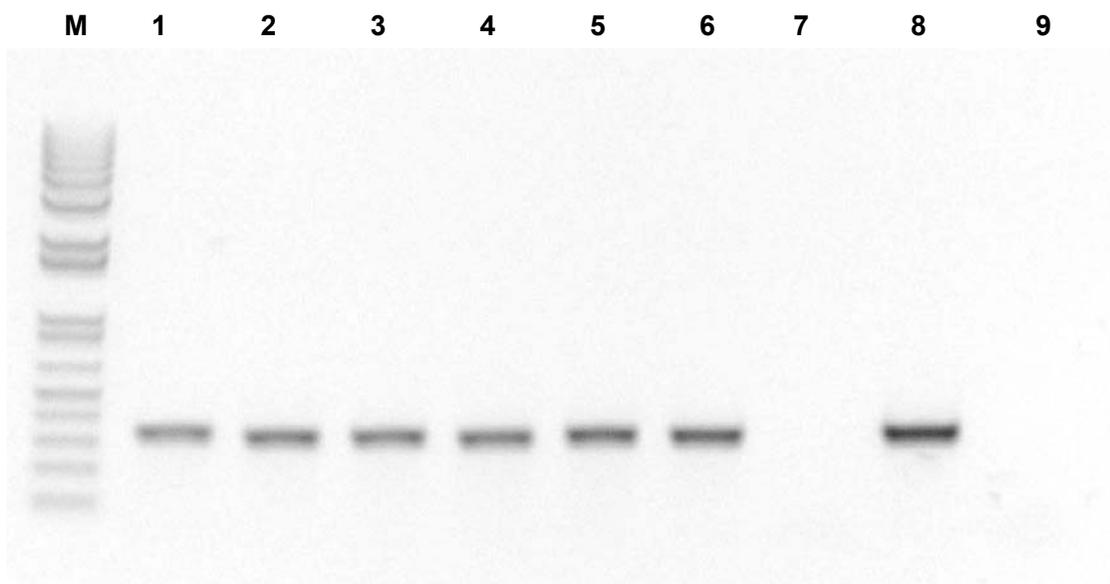


Fig. 8. Detecção do pKeratin-GFP nos espermatozoides do linguado *Paralichthys orbignyanus* através de PCR. M, marcador molecular 1KB plus; Colunas 1 e 2, sêmen lavado com a solução I e incubado com 10 e 50 ng/ μ L de pKeratin-GFP, respectivamente; Colunas 3 e 4, sêmen lavado com a solução II e incubado com 10 e 50 ng/ μ L de pKeratin-GFP, respectivamente; Colunas 5 e 6, sêmen lavado com a solução III e incubado com 10 e 50 ng/ μ L de pKeratin-GFP, respectivamente; Coluna 7, sêmen fresco (controle negativo); Coluna 8, pKeratin-GFP (controle positivo); Coluna 9, branco.

Discussão geral

Atualmente, a indústria da aqüicultura tem focado os esforços, principalmente, na obtenção de desovas de boa qualidade e tem dado pouca importância a qualidade do sêmen utilizado. Entretanto, o sêmen é tão importante quanto à obtenção de uma boa desova, já que este afeta também a produção e a qualidade das larvas (Rurangwa *et al.*, 2004). Dessa forma, estudos relacionados à caracterização do sêmen de animais que possuem um potencial para serem utilizados na aqüicultura são importantes. No presente trabalho, o sêmen do linguado *P. orbignyanus* foi caracterizado física e quimicamente ao longo da estação reprodutiva, sendo que essas informações podem, agora, auxiliar na seleção dos melhores reprodutores para serem utilizados na fertilização artificial de desovas.

Vários parâmetros têm sido sugeridos como indicadores de qualidade do sêmen, entretanto a motilidade é o parâmetro mais empregado, já que está diretamente relacionada à capacidade de fertilização dos espermatozoides. Para ajudar na avaliação da motilidade dos espermatozoides, métodos rápidos e quantitativos começam a ser empregados na aqüicultura. Uma dessas ferramentas é a análise espermática realizada por computador (CASA, computer-assisted sperm analysis), na qual foi inicialmente desenvolvida para examinar a qualidade do sêmen de mamíferos e aves, mas começa a ser aplicada em peixes. As informações obtidas com essa técnica relacionadas a motilidade são precisas e acuradas, facilitando a identificação dos melhores reprodutores a serem utilizados nos processos de fertilização artificial (Kime *et al.*, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2007), trabalhando com o *Pagrus major*, mostraram que essa ferramenta, também, pode ser utilizada para avaliar a qualidade do sêmen criopreservado. Entretanto, o uso dessa técnica na aqüicultura ainda é limitado devido ao elevado custo do equipamento (Kime *et al.*, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004). No presente trabalho, a motilidade do sêmen foi avaliada de forma subjetiva, entretanto, serviu como um bom indicador da qualidade do sêmen, principalmente no desenvolvimento dos protocolos de criopreservação e de manipulação genética.

Recentemente, foi verificado que células espermáticas de touro criopreservadas possuem um maior potencial de internalizar o DNA exógeno do que células que não sofrem nenhum choque físico (Anzar & Buhr, 2006). De acordo com esses autores, o processo de criopreservação pode induzir mudanças na membrana plasmática o que

pode facilitar tanto a ligação quanto a internalização do DNA exógeno nas células. Shen *et al.* (2006) observaram, também, que a incubação de células espermáticas com DNA exógeno junto com DMSO facilita a internalização do DNA e, conseqüentemente, aumenta as taxas de produção de transgênicos. Além disso, Chen *et al.* (1998) demonstraram que o sêmen de tilápia eletroporado com DNA exógeno e, posteriormente criopreservado pode ser utilizado com sucesso na produção de peixes transgênicos. Estes fatos ilustram a importância do domínio da metodologia de criopreservação, pois pode ser mais uma ferramenta para auxiliar na produção de animais transgênicos usando a TGME.

A transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME) é regulada por uma série de fatores, entretanto Lavitrano *et al.* (2003) tem demonstrado que dois parâmetros possuem uma importância diferencial para que a técnica seja eficiente em porcos. Primeiro, um bom reprodutor deve ser selecionado. Para isso, parâmetros como volume, concentração de células, presença de espermatozoides anormais e motilidade devem ser analisados para a escolha dos melhores reprodutores. Entre esses parâmetros, a motilidade foi a que teve a maior relação com a interação do DNA exógeno com as células espermáticas. Segundo, as células espermáticas oriundas de diferentes reprodutores possuem uma habilidade intrínseca para interagir com o DNA exógeno. No presente estudo, todos os parâmetros citados acima foram avaliados com exceção da presença de células anormais. Além disso, foi demonstrado que não há diferença entre o percentual de células móveis durante a estação reprodutiva. Entretanto, foi possível observar uma grande variação entre os indivíduos, ao longo de todo o período reprodutivo. Isso demonstra que esse parâmetro deve ser estudado com cuidado já que tem grande importância na interação dos espermatozoides com o DNA exógeno. Embora, não tenha sido descrito no capítulo I, os animais de cativeiro estão todos “chipados” e, além disso, já foi feita a caracterização do sêmen desses animais ao longo da estação reprodutiva. Dessa forma, já se tem informações dos animais que produzem o sêmen de melhor qualidade ao longo da estação reprodutiva o que deve facilitar a escolha dos animais que devem ser utilizados na TGME.

Nas últimas décadas, a indústria da aquicultura tem concentrado esforços na implementação de programas de melhoramento genético através do uso de técnicas modernas (manipulação de genes e cromossomos, criopreservação de gametas,

mapeamento do genoma e uso de marcadores moleculares) para aumentar a produção e, conseqüentemente reduzir os custos de cultivo. Todas essas metodologias têm fornecido bons resultados a nível experimental, entretanto a aplicação em larga escala em espécies de interesse comercial ainda é limitada (Felip *et al.*, 2001; Hulata, 2001; Rasmussen & Morrisey, 2007). Com relação ao linguado *P. orbignyanus*, que possui uma taxa de crescimento específico relativamente baixa (Sampaio *et al.* 2001), o emprego de um programa de melhoramento genético deve ser realizado para aumentar o potencial do seu cultivo. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo além de auxiliar no manejo reprodutivo dessa espécie devem facilitar a implementação de um programa de melhoramento genético tanto da forma clássica através da criopreservação do sêmen dos reprodutores que apresentam as melhores características fenotípicas, como através de técnicas modernas como a produção de animais transgênicos através da TGME.

Bibliografia

- ANZAR, M. & M.M. BUHR. 2006. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology*, 65: 683–690.
- CHEN, J.D., T.T. TSAY, J.M. SHIE & R.H. CHERN. 1998. Generation of transgenic tilapia by using cryopreserved electroporated sperm to mediate gene transfer. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 25: 265-272.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO & F. PIFERRER. 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 111: 175-195.
- HULATA, G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155-173.
- KIME, D.E., K.J.W. VAN LOOK, B.G. MCALLISTER, G. HUYSKENS, E. RURANGWA & F. OLLEVIER. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 130: 425-433.
- LAVITRANO, M., M. FORNI, M.L. BACCI, C. DI STEFANO, V. VARZI, H. WANG & E. SEREN. 2003. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol. Reprod. Dev.*, 64: 284-291.

- LIU, Q.H., J. LI, Z.Z. XIAO, F.H. DING, D.D. YU & X.Z. XU. 2007. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture*, 263: 20-25.
- RASMUSSEN, R.S. & M.T. MORRISSEY. 2007. Aquaculture: Transgenics and Polyploidy. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6:2-16.
- RURANGWA, E., D.E. KIME, F. OLLEVIER & J.P. NASH. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1-28.
- SAMPAIO, L.A., A. BIANCHINI & V.R. CERQUEIRA. 2001. Growth of juvenile Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *J. Appl. Aquac.*, 11:67-75.
- SHEN, W., L. LI, Q. PAN, L. MIN, H. DONG & J. DENG. 2006. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 589-594.

Conclusões gerais

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- O fenômeno do envelhecimento dos espermatozoides ao longo da estação reprodutiva comum para outras espécies de Pleuronectiformes não é evidente no linguado *P. orbignyanus*.

- Ambas soluções crioprotetoras (DMSO+sacarose e glicerol+salino) utilizadas neste estudo foram eficientes em manter a qualidade do sêmen.

- O plasma seminal do linguado *P. orbignyanus* contém uma forte atividade da enzima DNase.

- Os espermatozoides do linguado *P. orbignyanus* são capazes de internalizar o DNA exógeno após serem tratados para eliminar a atividade da enzima DNase.