

QUALIDADE DO SÊMEN DE RÃ-TOURO EM DIFERENTES DOSAGENS DE HORMÔNIO, TEMPOS DE COLETA E DE RESFRIAMENTO

QUALITY OF RAINFOY SEMEN IN DIFFERENT HORMONE, COLLECTION AND COOLING TIME

MARCELO MAIA PEREIRA

Pesquisador da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), Centro de Treinamento em Aquicultura do Centro-Sul Fluminense, Rio das Flores, Rio de Janeiro, Brasil.
mmaiap2001@yahoo.com.br

SILVIA CONCEIÇÃO REIS PEREIRA DE MELLO

Pesquisadora da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), Estação de Aquicultura Almirante Paulo Moreira, Guaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Professora do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Local do Centro Universitário Augusto Motta.
silviaqua@uol.com.br

JOSÉ TEIXEIRA SEIXAS FILHO

Professor do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Local do Centro Universitário Augusto Motta, Av. Paris, 84 Bonsucesso, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
jseixas4@gmail.com

WILLIAM NASCIMENTO SILVA

Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; estagiário da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ).
Willian_pok@hotmail.com

RESUMO

A fertilização artificial é uma importante técnica para os produtores de rãs obterem formas jovens. O estudo foi realizado com os seguintes objetivos, o primeiro foi verificar qual melhor dosagem do hormônio para indução a espermiacção e o tempo em horas que o sêmen de rã-touro apresenta motilidade espermática após resfriamento a 10° C, e o segundo foi avaliar o sêmen da rã-touro coletado em quatro dias sequenciais após a indução por hormônio. Para determinar a dosagens de hormônio para indução e coleta do sêmen são necessários mais estudos. A refrigeração do sêmen em até 24 horas pode ser uma alternativa para o produtor no processo de fertilização artificial da rã-touro.

Palavras-chave: Conservação. Espermatozoide. Reprodução.

ABSTRACT

Artificial fertilization is an important technique for frog producers to obtain young forms. The study was carried out with the following objectives; the first one was to verify the best dosage of the hormone for sperm induction, according to which the time in hours that the bullfrog semen shows sperm motility after cooling to 10 ° C, and The second was to evaluate the bull frog semen collected in four sequential days after hormone induction. The hormone dosages for induction for semen collection require further studies and the cooling of the semen in up to 24 hours may be an alternative to the producer for use in the artificial fertilizations of the bullfrog.

Keywords: Conservation. Sperm. Reproduction.

1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal tem uma função primordial na produção de carne, por representar a fase inicial da geração das formas jovens que irão para os setores de engorda e finalmente para mesa do consumidor. Além disso, possui função de caráter conservacionista por gerar descendentes de inúmeras espécies para reposição em ambientes em restauração (PEREIRA et al., 2012).

Obtenção de gametas (espermatozoides) de rãs através da indução de hormônios (Waggener e Carrol Jr, 1998) pode ter um impacto importante no melhoramento genético na produção de rãs-touro, pois poderá facilitar a troca de material genético entre os produtores e principalmente os pequenos que possuem pequeno número de animais para reprodução.

Não somente a obtenção de gametas, mas a conservação deste é importante, vários produtos e técnicas de criopreservação foram aplicados para anfíbios anuros (Michael e Jones, 2004; Sargent e Mohun, 2005; Kouba et al., 2009; Kouba e Vance, 2009), entretanto em sua maioria adotam produtos e equipamentos de alta tecnologia e que necessitam de investimentos altos que inviabilizam seu uso por parte dos produtores por elevar o custo de produção.

A rã-touro é a espécie criada no Brasil para produção de carne (Oliveira, 2015), esta espécie necessita de temperatura e fotoperíodo para o desenvolvimento do aparelho reprodutivo (Figueiredo et al., 1999), a técnica da fertilização artificial desenvolvida para rã-touro (Agostinho et al., 2002) foi adotado como protocolo em alguns ranários, porém necessita de melhorias principalmente para aumentar a taxa de fecundação.

O estudo foi realizado para verificar qual melhor dosagem do hormônio para indução a espermição e o tempo em horas que o sêmen de rã-touro apresenta motilidade espermática após resfriamento a 10° C, e ainda para avaliar o sêmen da rã-touro coletado em quatro dias sequenciais após a indução por hormônio.

2 METODOLOGIA

2.1 Condições experimentais

Os experimentos foram realizados na Unidade de Pesquisa em Ranicultura da Fundação Instituto de Pesca do estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) em Guaratiba, na cidade do Rio de Janeiro-RJ.

Machos de rã-touro (*Lithobates catesbeiana*)

foram amostrados para os ensaios experimentais e estavam no setor de engorda em baias de formato circular de lona, cada baia apresenta 6,6 m² de área útil, sendo $\frac{3}{4}$ da baia inundada e $\frac{1}{4}$ da baia com piso seco. O abastecimento de água consiste em sistema de recirculação de água, com passagem em biofiltro e a alimentação dos animais composta de ração comercial com 40% de proteína bruta (Mello et al., 2016).

Os machos amostrados foram colocados em uma baia do sistema inundado, já descrita anteriormente, onde foi instalado um sistema com três lâmpadas incandescente de 60W programadas com timer digital para um regime de fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 de escuro e temperatura ambiente entre 25 a 30°C. Os animais colocados permaneceram por 48 horas nessa baia sem alimentação até o início dos experimentos.

Os machos de rã-touro amostrados apresentaram peso superior a 200g e as características sexuais secundárias da espécie (papo amarelado, presença do calo nupcial, reflexo ao amplexo sexual e vocalização) (Lima et al., 1998; Costa et al., 1998).

A coleta do sêmen em todos os machos, foi realizada após a aplicação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Sincroforte®). A aplicação foi realizada na cavidade celomática do animal com uma seringa descartável de 1 mL (modelo para aplicação de insulina em humanos), após aplicação os animais foram colocados em balde com 200mL de água para cada animal. Após uma hora da aplicação foram realizadas as coletas do sêmen através de uma pipeta de vidro com capacidade de 2 mL.

2.2 Parâmetros avaliados

O volume de sêmen é expresso em mL e para coleta foi introduzida uma pipeta de 2mL na cloaca do macho da rã-touro e o volume foi aferido com auxílio de uma proveta de capacidade de 10 mL.

Vigor representa a intensidade do movimento espermático, é classificado de 1 a 5, sendo 1: exclusivamente classificatório; 2: lento; 3: intermediário; 4: progressivo retilíneo rápido e 5: progressivo retilíneo e muito rápido (CBRA, 2013).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por mm³. O procedimento consistiu na contagem das células na câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz com objetiva de 100 x.

2.3 Experimento 1

O ensaio foi realizado com sêmen de 14 machos. A coleta do sêmen foi realizada após a aplicação de 0,1 mL (0,4 µg de acetato de busarelina) do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Sincroforte®) para os animais do tratamento 1 e de 0,2 mL do hormônio para o tratamento 2.

Após a coleta do sêmen, as amostras foram avaliadas quanto ao volume, vigor e concentração espermática.

2.4 Experimento 2

O ensaio foi realizado com sêmen de 14 machos, sendo dois grupos de machos, o tratamento 1 com peso na faixa de 300 a 450g e o tratamento 2 com 600 a 900 g. A coleta do sêmen foi realizada após a aplicação de 0,1 mL (0,4 µg de acetato de busarelina) do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Sincroforte®) para cada animal independente do peso. Após a coleta do sêmen foi amostrado um volume 1,5 mL de sêmen de cada macho de cada tratamento e colocado em tubo tipo ependorf com capacidade de 1,5 mL, após esta etapa todos os tubos foram colocados em uma geladeira com temperatura ajustada em 10°C.

Uma alíquota de 10 µL foi retirada e colocada em uma lâmina para visualização em microscópio de luz de cada amostra de sêmen e esta amostra foi analisada antes de ser acondicionada na geladeira e a cada 24 horas até às 96 horas, num total de cinco análises para cada repetição amostral.

Neste experimento somente o vigor foi verificado como parâmetro de avaliação.

2.5 Experimento 3

O ensaio foi realizado com sêmen de sete machos, com peso na faixa de 300 a 450g. A coleta do sêmen foi realizada após a aplicação de 0,1 mL (0,4 µg de acetato de busarelina) do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Sincroforte®) para cada animal independente do peso, este manejo reprodutivo foi realizado a cada 24 horas, totalizando 4 coletas.

Após as coletas, os sêmens foram avaliados quanto ao volume e vigor, após análises amostras foram coletadas em tubo tipo ependorf com capacidade de 1,5 mL, após esta etapa todos os tubos foram colocados em uma geladeira com temperatura ajustada em 10°C e após 24 horas foram analisadas novamente o vigor de cada amostra.

2.6 Estatística

Os resultados encontrados no experimento 1 para os parâmetros avaliados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Barlett para verificar a normalidade e a homocedasticidade dos dados, posteriormente foi realizada a análise de variância (ANOVA), e caso necessário as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, todos os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio de um programa estatístico (SAS, 2008).

Os resultados encontrados nos experimentos 2 e 3 para os parâmetros avaliados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Barlett para verificar a normalidade e a homocedasticidade dos dados, posteriormente foi realizada a análise de regressão polinomial a 5% de probabilidade, todos os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio de um programa estatístico (SAS, 2008).

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1

O volume seminal obtido dos machos de rã-touro que receberam a dosagem de 0,1 mL do hormônio reprodutivo foi maior que aqueles que receberam o dobro da dosagem (Tabela 1), quanto a concentração espermática o resultado foi oposto (Tabela 1) e o vigor espermático foram semelhantes para ambas as dosagens.

Tabela 1: Qualidade do sêmen de rã-touro coletado após indução por duas diferentes dosagens do hormônio acetato de busarelina (GnRHa).

Treatamento (dose hormônio/mL)	0,1 mL	0,2 mL
Peso vivo médio (g)	320,29±33,87 a	297,71±23.89 a
Relação dose / peso vivo (mL/g)	3,3x10 ⁻⁴ ±0,2 x10 ⁻⁴ b	7,0 x10 ⁻⁴ ±0,5 x10 ⁻⁴ a
Volume seminal (mL)	7,00±1,00 a	3,69±0,64 b
Concentração espermática (SPTZ/mL)	3,52x10 ⁶ ±0,82x10 ⁶ b	14,45x10 ⁶ ±2,26 x10 ⁶ a
Vigor espermático (1-5)	3,71±0,29 a	3,86±0,34 a

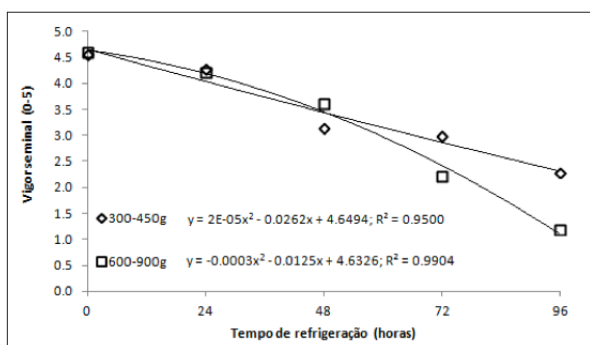
^aMédia ± Erro Padrão; ^bLetras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pela análise de variância ao nível de 5%.

Fonte: Elaborada pelos autores

3.2 Experimento 2

O vigor do sêmen in natura é indiscutivelmente melhor do que o sêmen refrigerado (Figura 1), independente do peso dos machos de rã-touro, porém até 24 horas a diferença não é muito grande, e a partir das 48 horas de refrigeração verificou que o sêmen do machos mais leves (300-405g) possuem qualidade melhor do que os mais pesados (600-900g).

Figura 1: Vigor seminal de rã-touro em diferentes pesos corporais submetido à refrigeração.

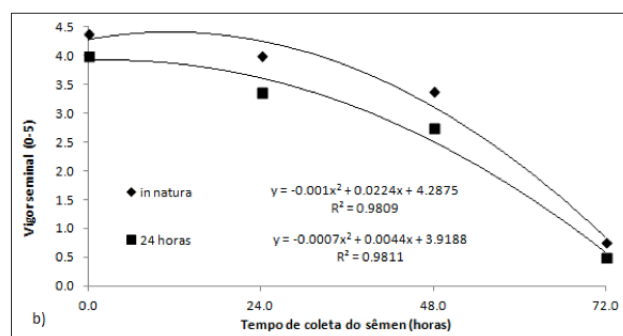
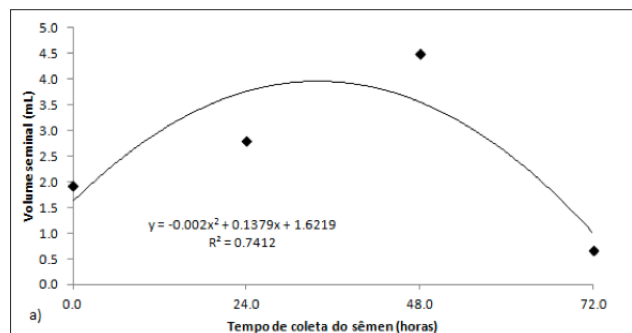


Fonte: elaborada pelos autores

3.3 Experimento 3

O volume seminal da rã-touro em coletas sequenciais a cada 24 horas, revelou que até a terceira coleta ou 48 horas o volume aumenta, depois há decréscimo bem acentuado (Figura 2a), entretanto, o vigor, ou seja, qualidade dos espermatozoides decresce nas sequencias das coletas (Figura 2b), em comparação ao sêmen in natura e o refrigerado o sêmen coletado no momento apresenta melhor vigor que o refrigerado, mas a tendência é a mesma.

Figura 2: Volume seminal de rã-touro coletados do mesmo espécime durante 72 horas em intervalos de 24 horas (a), comparativo entre o vigor seminal da rã-touro coletado in natura com o mesmo submetido à refrigeração por 24 horas de cada coleta e sêmen de rã-touro em intervalos de 24 horas (b).



Fonte: Elaborada pelos autores

4 DISCUSSÃO

Os valores de concentração espermática encontrados na Tabela 1 estão próximos da faixa encontrada para os machos de rã-touro induzidos com 0,1 mL do produto reprodutivo ou 0,4µg de acetato de buserelina de 8.8 a 23.2 x 10⁶ espermatozoides/mL (Pereira et al., 2013), não somente este parâmetro de avaliação como o volume necessitam de uma relação direta com a fecundação para se ter maior certeza de uma dose correta para estimular o macho para coleta do seu sêmen.

A dose correta para indução e coleta do sêmen é uma informação que ainda não se tem com exatidão, por exemplo, ao comparar hormônios de GnRH com ou sem antagonistas foi adotada a dosagem de 2,1µg de acetato de buserelina para cada Kg de animal (Nascimento et al., 2014), em outro trabalho para indução dos machos a dosagem para coleta de esperma foi 10 µg de LHRHa por kg de peso vivo (Agostinho et al., 2000), em todos esses trabalhos houve fertilização dos ovos com índices variáveis, ou seja, essa questão necessita de mais estudos.

O tempo de motilidade do sêmen dos anfíbios é longo (Browne et al., 2014), característica importante pois permite atrasos durante a fertilização artificial, pois primeiro se faz a coleta do sêmen e depois a extrusão dos ovúlos, mas com os resultados dos experimentos dois e três abre-se uma hipótese que até 24 horas sendo refrigerado pode apresentar boa fecundação, porém necessita de confirmação.

Em relação aos animais, no experimento 2 verificou-se que animais mais leves podem apresentar melhor qualidade seminal, porém somente quando o sêmen foi estocado por maior tempo.

Machos de rã-touro devem ser submetidos a descansos maiores que 24 horas para coletas sucessivas, pois a qualidade do sêmen em relação ao vigor decresce ao longo das coletas.

