

# EFEITOS DA OSMOLARIDADE SOBRE A MOTILIDADE ESPERMÁTICA NA PIABANHA *Brycon insignis*

Eduardo Shimoda<sup>1,2,3,4</sup>  
Dalcio Ricardo de Andrade<sup>2</sup>  
Manuel Vazquez Vidal Júnior<sup>2</sup>  
George Shigueki Yasui<sup>2</sup>  
José Frederico Straggiotti Silva<sup>2</sup>  
Hugo Pereira Godinho<sup>5</sup>  
Guilherme Souza<sup>6</sup>

## RESUMO

A piabanha é uma espécie de peixe ameaçada de extinção. Os esforços para sua conservação incluem estudos a respeito da sua reprodução artificial e da criopreservação do sêmen. Tanto na avaliação da motilidade espermática quanto na criopreservação, o sêmen é diluído em soluções hiperosmóticas em relação ao plasma seminal. A ativação dos espermatozoides é feita mediante a diluição em soluções com osmolaridade inferior à do plasma seminal. Os objetivos deste trabalho foram verificar a motilidade espermática do sêmen da piabanha *Brycon insignis* em soluções de NaCl de várias osmolaridades, para obter uma solução pré-diluidora não ativadora da motilidade, e determinar a osmolaridade mínima necessária para a solução diluidora do sêmen com finalidade de criopreservação. Amostras seminais de 3 piabanhas hipofisadas (0,5 mg de extrato bruto de hipófise/kg de peso), criadas na Estação Experimental do Projeto Piabanha (Itaocara-RJ), foram coletadas por meio de massagem abdominal. Uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina de vidro em um microscópio pré-focalizado. Adicionaram-se, então, duas gotas de solução de NaCl com as seguintes osmolaridades (mOsm): 0, 68, 137, 205, 274, 342, 410, 479, 547. Verificou-se que osmolaridade de até 274mOsm ativou praticamente todos os espermatozoides, mas com 342mOsm, apenas parte dos espermatozoides foi ativada. Quando a solução acrescentada apresentou 410mOsm ou mais, não ocorreu ativação espermática. Conclui-se, portanto, que essa osmolaridade não ativa a motilidade espermática e pode ser utilizada como solução pré-diluidora de sêmen nessa espécie.

**Palavras Chave:** reprodução, sêmen, peixe, osmolaridade, motilidade.

## ABSTRACT

### OSMOLARITY EFFECTS ON SPERM MOTILITY OF PIABANHA *BRYCON INSIGNIS*.

Piabanha *Brycon insignis* is an endangered species whose conservation efforts include studies on induced spawning and sperm cryopreservation. In both cases, the evaluation of sperm motility and cryopreservation, the semen is diluted using hyper-osmotic extender in relation to the seminal plasma. Sperm activation is accomplished by activating solutions with lower osmolarity than the seminal plasma. The aim of this article was, therefore, to verify the sperm motility of piabanha *Brycon insignis*, in a series of NaCl solutions of different osmolarities to obtain an

<sup>1</sup> Universidade Candido Mendes. Pq. São Caetano. Campos dos Goytacazes - RJ.

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense. RJ. E-mail: eduardo\_shimoda@uol.com.br; dalcio@uenf.br; mvidal@uenf.br; yasui\_hokudai@yahoo.com.br; straggio@uenf.br

<sup>3</sup> Facastelo. Rua Luiz Ceotto. Castelo - ES.

<sup>4</sup> Universidade Estácio de Sá. Campos dos Goytacazes - RJ.

<sup>5</sup> PUCMinas. Belo Horizonte - MG. E-mail: hgodinho@pucminas.br

<sup>6</sup> Projeto Piabanha. Itaocara - RJ. E-mail: projpiabanha@okinternet.com.br.

extender solution that does not activate sperm motility and determine the minimum osmolarity for the extender solution to be used in sperm cryopreservation. Three “piabanhas” from the Experimental Station of the Piabanha Project (Itaocara, Rio de Janeiro, Brazil) were induced to spawn (0.5 mg carp pituitary gland/kg male) and sperm samples were collected by stripping. A drop of semen was placed on a slide, and then examined under a previously-focused microscope. Then, two drops of NaCl solution were added with the following osmolarities (mOsm): 0, 68, 137, 205, 274, 342, 410, 479, 547. Osmolarities higher than 275mOsm activated most of spermatozoa. At 342mOsm, only part of spermatozoon was activated. No sperm activation occurred when solution at 410mOsm or higher was added and, therefore, it does not activate sperm motility and can be used as a sperm extender for this specie.

**Key Words:** reproduction, semen, fish, osmolarity, motility.

## INTRODUÇÃO

A piabanha *Brycon insignis* é uma espécie de peixe encontrada naturalmente apenas na bacia do rio Paraíba do Sul (Nomura, 1984), cuja população vem reduzindo-se rapidamente, a ponto de ser considerada oficialmente em extinção (Brasil, 2004). Planos de recuperação da população da espécie têm sido implantados nos últimos anos, incluindo o desenvolvimento de estudos a respeito da produção de alevinos para repovoamento (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001a,b) e criopreservação do sêmen (Shimoda *et al.*, 2004a).

Todos os experimentos sobre motilidade e criopreservação do sêmen relatados foram realizados com diluição (Billard & Cosson, 1992). Uma vez que a duração da motilidade é curta (1-2 min para os espermatozóides da maioria das espécies) e o movimento espermático varia durante a fase de motilidade, a diluição é uma peça chave para a determinação da dinâmica de ativação. A sobreposição dos fatores de inibição (alta concentração de potássio e alta osmolaridade) que acarretariam a ativação simultânea de todos os espermatozóides viáveis somente poderia ser obtida com uma diluição seminal da ordem de 1000 vezes. É proposto um procedimento, dividido em duas etapas, para eficiente obtenção desta ativação: (1) uma diluição não ativadora, de 100 vezes, em solução com osmolaridade igual ou superior à do fluido seminal, e (2) outra diluição, ativadora, com água destilada, da ordem de 20 vezes.

Variações na pressão osmótica induzem a motilidade espermática em muitas espécies de peixe (Suquet *et al.*, 1994) e, ao contrário, alta osmolaridade inibe a atividade espermática em ciprinídeos, como o *Carassius auratus*, a carpa-comum *Cyprinus carpio* (Morisawa *et al.*, 1983) e salmonídeos (Morisawa & Suzuki, 1980; Turdakov, 1970). Experimentalmente, alta pressão osmótica pode ser

utilizada fixamente para inibir a motilidade, por exemplo, durante a diluição do sêmen antes da criopreservação (Billard & Cosson, 1992). Em trabalho com a piabanha (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001a), foi verificada motilidade média de 90,9%, após a adição de 2 gotas de NaHCO<sub>3</sub> 1% a uma gota de sêmen.

O objetivo deste trabalho foi, portanto, verificar a influência da osmolaridade na motilidade espermática da piabanha.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes, oriundos da Estação Experimental do Projeto Piabanha, localizada no município de Itaocara (RJ), foram despescados dos tanques externos de cultivo. Três machos, em estágio de maturação avançada, verificada pela vertência de sêmen sob compressão abdominal, foram selecionados e transportados até o laboratório, onde foi feita a biometria (medição do peso e comprimento) dos animais.

Os peixes foram submetidos à indução hormonal da espermição, sendo aplicado 0,5mg de extrato bruto pituitário de carpa por quilograma de peso (Woynarovich & Hórvath, 1983). A coleta de sêmen foi realizada 260h-grau após a aplicação, com massagem abdominal no sentido ântero-posterior. O poro urogenital, assim como as regiões adjacentes, foram devidamente secas e limpas, e as porções do sêmen contaminadas com sangue e/ou urina descartadas.

Imediatamente após a extrusão, as amostras seminais de três exemplares de piabanha foram colocadas em maleta térmica com gelo e mantidas a 4°C. A seguir, foram misturadas 1 gota de sêmen e 2 gotas de soluções salinas com diferentes concentrações e osmolaridades, cujos valores estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Concentrações (g de NaCl/100 mL de água destilada) e osmolaridades (mOsm) das soluções testadas para verificação da motilidade espermática no sêmen de piabanha *Brycon insignis*

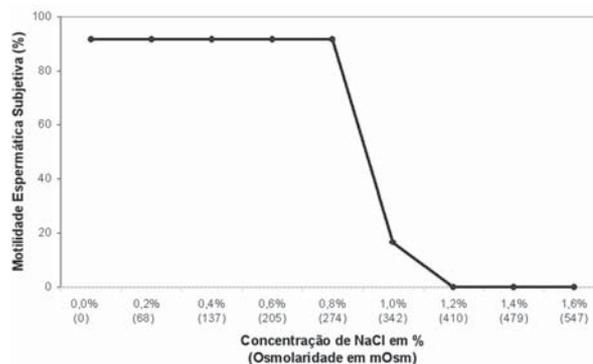
Concentração (%)	Osmolaridade (mOsm)
0	0
0,2	68,38
0,4	136,75
0,6	205,13
0,8	273,50
1,0	341,88
1,2	410,26
1,4	478,63
1,6	547,01

A percentagem de espermatozoides móveis foi determinada subjetivamente, mediante observação ao microscópio óptico comum, sob aumento de 400 vezes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados relacionados à motilidade espermática quando o sêmen foi diluído em diferentes concentrações salinas são apresentados na Tabela 2 (dados individuais) e na figura 1 (médias).

Considerando que a osmolaridade média do plasma seminal da piabanha é de 286 mOsm (Shimoda *et al.*, 2004b), é possível verificar que, quando o sêmen é diluído em soluções cujas osmolaridades são inferiores à do plasma seminal (de 0 a 274 mOsm), praticamente todos os espermatozoides são ativados. A inibição parcial ou total dos espermatozoides ocorre quando a diluição é realizada em soluções com osmolaridades superiores à do plasma. Os espermatozoides do exemplar 2 (Tabela 2) não apresentaram motilidade quando a diluição ocorreu em



**Figura 1** - Motilidade espermática subjetiva do sêmen de piabanha *Brycon insignis* submetido a soluções de NaCl com diferentes osmolaridades.

solução de 341,88 mOsm. Entretanto, os espermatozoides dos outros dois exemplares testados apresentaram alguma motilidade na mesma situação. A partir de 410,26 mOsm, nenhum dos exemplares apresentou qualquer tipo de ativação espermática. Estes resultados corroboram outros trabalhos realizados com salmonídeos, nos quais foi verificado que a alta pressão osmótica (400 mOsm) inibe a motilidade espermática (Morisawa & Suzuki, 1980; Suquet *et al.*, 1994). Também verificou-se que os espermatozoides da tilápia *Oreochromis mossambicus* são ativados quando a osmolaridade da solução diluente varia de 0 a 333 mOsm (Linhart & Kvaniscka, 1992). Tanto em salmonídeos quanto na tilápia, a osmolaridade do plasma seminal é de aproximadamente 350mOsm.

Diversos trabalhos (Kavamoto *et al.*, 1986; Silveira *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 1991; Linhart & Kvaniscka, 1992; Shimoda, 1999; Andrade-Talmelli *et al.*, 2001a, b; Shimoda *et al.*, 2004b) relatam à ativação dos espermatozoides adicionando 2 gotas de água a 1 gota de sêmen. Entre-

**Tabela 2.** Motilidade espermática (em %) no sêmen da piabanha *Brycon insignis* (n=3) verificada em diferentes soluções de NaCl. Dados individuais, médias, desvios-padrão e coeficientes de variação (C.V. - %)

Número do Exemplar	Concentrações de NaCl, em % (osmolaridades, em mOsm)									
	0,0% (0)	0,2% (68)	0,4% (137)	0,6% (205)	0,8% (274)	1,0% (342)	1,2% (410)	1,4% (479)	1,6% (547)	
Peixe 1	95%	95%	95%	95%	95%	30%	0%	0%	0%	
Peixe 2	90%	90%	90%	90%	90%	0%	0%	0%	0%	
Peixe 3	90%	90%	90%	90%	90%	20%	0%	0%	0%	
Média	91,67%	91,67%	91,67%	91,67%	91,67%	16,67%	0%	0%	0%	
Desvio-padrão	2,89%	2,89%	2,89%	2,89%	2,89%	15,28%	0%	0%	0%	
C.V.(%)	3,15%	3,15%	3,15%	3,15%	3,15%	91,65%	-	-	-	

tanto, essa metodologia não proporciona a ativação simultânea de todos os espermatozoides (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001a). A diluição requerida para obtenção de eficiente ativação de todos os espermatozoides é relativamente alta (1/1000). A metodologia utilizada ainda hoje em alguns centros de pesquisa no país, baseada em diluições menores, não permite a ativação simultânea de 100% dos espermatozoides. Isto se constitui em um problema na avaliação de motilidade, pois o espermatozoide dos peixes tem curto período de atividade após a ativação. A verificação da motilidade espermática em soluções com diferentes osmolaridades poderá permitir a adaptação do procedimento proposto existente (Billard & Cosson, 1992) para análise mais acurada do percentual de espermatozoides móveis no sêmen da piabanha.

## CONCLUSÃO

Os espermatozoides da piabanha não são ativados quando diluídos em soluções que contêm concentrações de NaCl superiores a 1,2% (410mOsm), podendo estas serem utilizadas em pré-diluições não ativadoras da motilidade.

## AGRADECIMENTOS

À FAPERJ e ao CNPq, pelo financiamento, e ao projeto Piabanha, pelas instalações e pelos animais.

## REFERÊNCIAS

- Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Fenerich-Verani N (2001a). Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. Boletim do Instituto de Pesca, 27:149-154.
- Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Romagosa E, Fenerich-Verani N (2001b). Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). Boletim do Instituto de Pesca, 27:21-28.
- Billard R & Cosson MP (1992). Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. The Journal of Experimental Zoology, 261:122-131.
- Brasil (2004). Instrução Normativa nº 05/04 – Reconhecimento como espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexploradas (invertebrados aquáticos e peixes) – Diário Oficial da União, Brasília, 21 Mai.
- Kavamoto ET, Silveira WF, Godinho HM (1986). Características seminais do curimatã, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. Boletim do Instituto de Pesca, 13:45-50.
- Linhart O & Kvaniscka P (1992). Artificial insemination in tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture and Fisheries Management, 23:183-188.
- Morisawa M & Suzuki K (1980). Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science, 210: 1145-1147.
- Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S & Yasuda K (1983). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. The Journal of Experimental Biology, 107:5-103.
- Nomura H (1984). Dicionário dos Peixes do Brasil. Brasília, Editerra. 482 p.
- Oliveira JCF, Barnabe VH, Silveira WF, Soares HA, Freitas EAN, Kavamoto ET (1991). Características seminais da carpa *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 28:81-87.
- Shimoda E, Andrade DR, Vidal Jr MV, Silva JFS, Souza G, Godinho HP, Yasui GS, Andrade CCF (2004a). Criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* utilizando-se DMSO, glicose e gema de ovo a diferentes proporções sêmen:diluyente, avaliada pelo analisador de motilidade computadorizado. In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004, Vitória-ES. Anais..., p. 196.
- Shimoda E, Andrade DR, Vidal Jr MV, Yasui GS, Silva JFS, Souza G, Godinho HP, Andrade CCF (2004b). Análise química do plasma seminal da piabanha *Brycon insignis*. In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Vitória-ES. Anais... p. 194.
- Shimoda E (1999). Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. Dissertação de mestrado. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 54p.
- Silveira WF, Kavamoto ET, Cestarolli MA, Godinho HM, Ramos SM, Silveira NA (1990). Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. Boletim do Instituto de Pesca, 17 (único): 1-13.
- 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
- Turdakov AF (1970). Effect of various concentrations of Ringer Solution on trout sperm behaviour. Biologični Nauki, 74:20-24.
- Woynarovich E & Horvath L (1983). A propagação artificial de peixes de águas tropicais. FAO/CODEVASF/CNPq. Brasília. 200 p.