

## **AValiação de Características Seminais de *Xiphophorus Helleri* em Diluente com Diferentes Osmolaridades**

VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA<sup>1</sup>; JANAÍNA CAMACHO SILVA<sup>2</sup>; ESTELA FERNANDES E SILVA<sup>2</sup>; CLARISSA DA SILVA FREITAS<sup>2</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JR<sup>2</sup>; BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – vitoria.guazzelli@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Por ser um passatempo muito popular, a aquarofilia possui milhões de adeptos em todo mundo (LIVENGOOD et. al, 2007), sendo a *Xiphophorus Helleri*, comumente conhecida por Espada, uma das espécies de peixes ornamentais de água doce mais criadas. Além disso, trabalhos relatam a eficiência desta espécie como bioindicadores de poluição ambiental. Seus sistemas orgânicos são muito mais próximos do ponto de vista histológico e fisiológico dos sistemas humanos (e de outros vertebrados), que os invertebrados, permitindo explorações mais confiáveis (CONNELL, 1997).

A busca pela melhoria dos processos de acondicionamento e análise de sêmen de peixes procura atender as exigências econômicas e ecológicas atuais. Para isso, a preservação seminal a curto prazo permite o estudo da qualidade das células espermáticas, além de facilitar o manejo e aumentar a eficiência da inseminação artificial na piscicultura (CIEREZKO & DABROWSKI, 1994).

A adição ao sêmen de meios diluentes que mimetizem a composição iônica e a osmolaridade do plasma seminal é efetiva em potencializar a longevidade, sem provocar mudanças significativas na qualidade das amostras (PEÑARANDA et al., 2010). Segundo SUQUET et. al. (1994), variações na pressão osmótica induzem a motilidade em muitas espécies de peixes, e ao contrário, a alta osmolaridade inibe a ativação espermática.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes osmolaridades do meio diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*) sobre parâmetros de qualidade espermática da espécie *Xiphophorus Helleri*.

### **2. METODOLOGIA**

Foram coletadas as gônadas de 10 peixes da espécie citada após terem sido submetidos a crioeutanásia. As gônadas foram mantidas em diluente BTS com osmolaridade variando de 240 a 460 mOsm/L em temperatura ambiente, após maceração para liberação dos gametas.

As amostras seminais passaram por análises em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo – Brasil) em aumento de 40x para avaliação dos seguintes parâmetros: integridade da membrana plasmática (ME) utilizando o corante Diacetato de Carboxifluorosceína, que penetra nas células de membrana íntegra e emite fluorescência verde e Iodeto de Propídeo que cora de vermelho os espermatozoides lesados. A integridade de DNA foi avaliada com corante Acridine Orange, emitindo fluorescência verde nas células com DNA íntegro

(com a dupla fita) e vermelho para as células com DNA lesado (com fita simples).

Também foi realizada análise da motilidade espermática (MOT) em microscópio óptico com aumento de 20x, após ativação das células espermáticas adicionando 1µL de sêmen diluído em BTS em 99 µL de água destilada a 22°C. Os resultados obtidos foram tabulados sendo comparados através do teste de Kruskal-Wallis adotando-se o nível de significância  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na tabela 1, a exposição das células espermáticas a diluentes com diferentes osmolaridades não afetou a integridade do DNA e a da membrana espermática. Entretanto, uma queda significativa na motilidade das células espermáticas foi observada nos diluentes com osmolaridade acima de 340mOsm/L.

ALAVI et. al. (2009) mostraram que a osmolaridade do meio altera a forma da onda flagelar, afetando assim a velocidade do espermatozoide. Os mesmos autores, trabalhando com *B. sharpeyi*, verificaram que a osmolaridade ideal para ativação das células espermáticas da referida espécie é de 100 e 200 mOsm/L. De forma semelhante ao observado na maioria das espécies de água doce, a hiperosmolaridade do meio em relação a do plasma seminal impede a motilidade (ALAVI et. al, 2010). Estes dados corroboram com os resultados encontrados para a motilidade de *Xiphophorus Helleri*, onde a alta osmolaridade, ou seja, acima de 380 mOsm/L, resultou em nenhum espermatozoide móvel.

Sabe-se que quando se adiciona um diluidor, a célula expande e encolhe de volume em resposta a hiperosmolaridade, o que desestabiliza as membranas ou o citoesqueleto levando a lesões (WATSON, 2000). Em nosso estudo não foi encontrada diferença estatística para os parâmetros de integridade de membrana e DNA, nem para viabilidade de mitocôndria, porém WINDSOR E WHITE (1995) comprovaram que a osmolaridade do meio pode interferir diretamente no metabolismo espermático. Expondo os gametas a meios hipotônicos (150 mOsm/L) ou hipertônicos (450 mOsm/L), constataram redução da concentração de Rodamina 123, indicando menor viabilidade mitocondrial.

Tabela 1. Características seminais após manutenção em 1 hora das amostras em diluente com diferentes osmolaridades. Foram avaliadas as variáveis integridade de DNA (DNA), integridade de membrana (ME), função mitocondrial (MI) e motilidade (MOT).

	Osmolaridade (mOsm/L)									
	240	260	280	300	320	340	360	380	400	460
DNA	88,7±2,92	97±3	99,7±0,3	100±0	99±0,6	89,5±10,5	97,7±2,3	96±3	98,7±1	99±1
ME	89,7±2,4	93,8±0,2	88,2±3,8	97,2±1,1	86,2±7,7	90,1±4,4	93±2	91±3	89,5±3	99±1
MOT	78,3±19,2 <sup>a</sup>	55±28,4 <sup>a</sup>	97,7±1,4 <sup>a</sup>	93±6,7 <sup>a</sup>	80±11,5 <sup>a</sup>	16,7±8,8 <sup>b</sup>	10±1 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>

Com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que novas análises sejam realizadas sobre outros padrões de viabilidade da célula espermática, como a fertilização de gametas, para poder se afirmar que a diluição do sêmen em diluentes com osmolaridade entre 240 e 320 mOsm/L não afeta as taxas de fertilidade.

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo conclui-se que osmolaridades entre 240 e 320 mOsm/L possibilitam uma melhor manutenção da qualidade seminal da espécie *Xiphophorus Helleri*, sendo estas indicadas para acondicionamento dos gametas dessa espécie. Assim como nas outras espécies de peixes de água doce, meios hiperosmóticos inibem a motilidade espermática, porém, sem afetar os outros parâmetros avaliados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S.M.H., RODINA, M., VIVEIROS, A.T.M., COSSON, J., GELA, D., BORYSHPOLETS, S. & LINHART, O. (2009) Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in northern pike (*Esox lucius* L.). **Theriogenology** 72, 32–43.

ALAVI, S.M.H.; JORFI, E.; HATEF, A.; MORTEZAVI, S.A.S. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Günther, 1874). **Aquaculture Research**, v.41, p.e688-e694, 2010.

CIEREZKO, A.; DABROWSKI, K. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.12, n.5, p.357-367, 1994.

CONNELL, D. W. **Basic concepts of environmental chemistry**. New York: Lewis Publishers. 1997.

LIVENGOOD, E. J., CHAPMAN, F.A., 2007. The Ornamental Fish Trade: An Introduction with Perspectives for Responsible Aquarium Fish Ownership. **Department of Fisheries and Aquatic Sciences**, 124.

PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; GALLEGO, V.; MAZZEO, I.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.659-664, 2010.

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.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000.

Windsor DP, White IG. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v.40, p.43-58, 1995.