

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



QUALIDADE ESPERMÁTICA DE JUNDIÁ SOB SALINIDADES REDUZIDAS

Martins, Gabriel Bernardes¹, Piedras, Sérgio Renato Noguez², Pouey, Juvêncio Luís Osório Fernandes², Robaldo, Ricardo Berteaux¹.

¹Depto. de Fisiologia e Farmacologia – IB/UFPeL. gmartins.ib@ufpel.edu.br

²Depto. de Zootecnia – FAEM/UFPeL

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

1. INTRODUÇÃO

Uma das dificuldades para a produção massiva de alevinos do jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) é a elevada frequência de ocorrência do protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, conhecido como o agente da doença dos pontos brancos (Baldisserotto & Radünz, 2005). Esse ciliado é responsável pela mortalidade de milhares de alevinos e juvenis em poucos dias (Boijink & Brandão, 2001). Miron *et al.* (2003) comprovaram a eficiência de banhos de NaCl na concentração de 4g/L sobre a infestação de *I. multifiliis* em juvenis da espécie.

O controle da reprodução é uma questão chave na aquicultura e um dos fatores limitantes no sucesso reprodutivo é a qualidade dos gametas (Bobe & Labbé, 2009). A indústria do cultivo de peixe tem sido mais focada na qualidade dos ovos e larvas do que na qualidade do sêmen. Entretanto, o sêmen é frequentemente inadequado em termos de qualidade e quantidade durante a fertilização artificial comumente empregada na piscicultura (Rurangwa *et al.*, 2004).

Os espermatozoides de peixes são quiescentes dentro do ducto seminal, sendo ativados somente quando liberados no meio. Algumas condições do meio estão associadas a sua ativação, como: pH, osmolaridade, temperatura, concentração de íons (Na^+ , K^+ e Ca^{+2}) e taxa de diluição (Cosson, 2004). Para *R. quelen*, altas concentrações de K^+ e baixas concentrações de Ca^{+2} no plasma seminal foram associadas à imobilização do esperma dentro do ducto seminal (Borges *et al.*, 2005). Geralmente, a motilidade espermática é induzida por pressão hiper-osmótica em peixes de água salgada e por hipo-osmótica em peixes de água doce (Alavi *et al.*, 2007). Quando o sêmen é liberado no meio externo (água-doce), a concentração de K^+ decresce por diluição, induzindo à hiperpolarização da membrana, que provoca a ativação dos espermatozoides (Boitano & Omoto, 1991).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sal marinho (NaCl) na viabilidade e qualidade dos gametas masculinos de *Rhamdia quelen*, como forma de melhorar o desempenho de sua produção sob o emprego deste agente profilático.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 25 machos adultos ($136 \pm 56g$). Os exemplares foram distribuídos em cinco tratamentos: 0, 2, 4, 6 e 8% de sal marinho não iodado e aclimatados por 15 dias até a coleta do sêmen. Foram utilizadas caixas plásticas de 180L com sistema de recirculação, biofiltro, aeração, fotoperíodo natural, temperatura ambiente e taxa de renovação 80%/semana. Os peixes foram alimentados diariamente com ração extrusada (Supra, Aqualine[®]) a uma taxa de arraçoamento de 10% da biomassa. A qualidade da água foi monitorada pelo acompanhamento diário do oxigênio dissolvido, temperatura, amônia e pH.

Para coleta do sêmen, três indivíduos de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente; medidos e pesados. Para extrusão do sêmen o poro genital foi devidamente seco, e aquele foi recolhido com seringa descartável mediante massagem abdominal. O volume total (VT) coletado foi determinado pelo aparecimento de sangue durante a extrusão e para padronização, este foi considerado em relação ao peso corpóreo dos machos ($VT = \text{volume coletado (mL)} / \text{peso (g)}$). Após a determinação do volume de sêmen coletado, 5 μL foi colocado em uma lâmina e ativado com 50 μL dos meios de tratamento; simultaneamente, a lâmina foi sobreposta com lamínula para análise em microscópio (400x). A contagem do tempo de motilidade (s) ocorreu com auxílio de um cronômetro.

O grau de motilidade foi classificado de acordo com a seguinte escala: 0 - inativo sem movimento, 1- vibração sem deslocamento e 2- deslocamento rápido. \circ percentual de células móveis foi determinado conforme escala arbitrária dividida em intervalos de 25%.

Para determinação do espermátócrito foi utilizada centrífuga de micro-hematócrito sob 13.000 RPM durante 15 min em tubos capilares não heparinizados.

Os dados de volume total de sêmen, o tempo de motilidade e o espermátócrito foram submetidos à análise de variância ANOVA (uma via) seguida de teste de Tukey; os dados de percentual e grau de motilidade foram comparados mediante ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, todos considerando o nível de significância de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o ensaio as variáveis relacionadas à qualidade da água não diferiram entre os tratamentos e apresentaram os seguintes valores médios (\pm desvio padrão): pH $8,57 \pm 0,07$, O_2 dissolvido $8,14 \pm 0,70\text{mg/l}$, temperatura $22,0 \pm 1,7^\circ\text{C}$, amônia $<0,01\text{mg/L}$ (não detectável).

Os valores de espermátócrito, percentual de células móveis, tempo e grau de motilidade dos espermatozoides e do volume total de sêmen estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da salinidade na qualidade espermática do jundiá (*Rhamdia quelen*) em cativeiro.

Salinidade (%)	Espermátócrito (%)	Volume de sêmen	Percentual de células móveis (%)	Tempo de motilidade (s)	Grau de motilidade
0	$88,9 \pm 4,3^{ab}$	$4,0 \pm 2,2$	75-100	38 ± 10^{ab}	2
2	$89,5 \pm 3,1^{ab}$	$1,7 \pm 0,4$	75-100	206 ± 118^c	2
4	$91,4 \pm 3,6^b$	$3,3 \pm 1,5$	75-100	200 ± 52^{bc}	2
6	$88,5 \pm 1,8^{ab}$	$2,9 \pm 2,1$	25-50	226 ± 79^c	2

8	87,0± 2,8 ^a	3,0 ± 2,9	0	0± 0 ^a	0
---	------------------------	-----------	---	-------------------	---

Letras diferentes demonstram diferença significativa entre médias (HSD Tukey; $p \leq 0,05$).

Os valores observados para o volume de sêmen e espermátocrito estão de acordo com aqueles apresentados para a espécie por Borges *et al.* (2005) e apesar da diferença significativa apontada para os tratamentos 4 e 8%, no caso do espermátocrito, a variação observada parece não responder a osmolaridade do meio.

Em relação aos parâmetros de motilidade o jundiá demonstrou tempo de ativação típico dos peixes de água-doce, tanto no meio controle quanto nos meios hiposalinos, com cerca de 30-40s de atividade em água-doce e até 200s nos meios de salinidade reduzida.

Para avaliar o efeito da inativação do sêmen à 8‰ sob a viabilidade espermática, meio à 2‰ foi utilizado para a ativação, induzindo a motilidade com tempo total médio de 74 s e comprovando que mesmo a maior concentração salina testada não inviabiliza a motilidade espermática. Esta inatividade observada pode ser explicada pelo fato de que a osmolaridade desta solução é muito próxima daquela do ponto isosmótico (260mOsm/kg) bem como do plasma seminal da espécie (275mOsm/kg) (Souza-Bastos & Freire, 2009; Borges *et al.*, 2005).

Os resultados demonstram a importância do aumento da osmolaridade até o ponto isosmótico da espécie, visto que, conforme indicado para outros peixes dulceaquícolas, a ação de hidratação dos espermatozóides em meios hiposmóticos promove a diluição da concentração intracelular do K^+ , constituindo o principal evento de ativação da motilidade espermática (Takai & Morisawa, 1995; Wilson-Leedy *et al.* 2009). Assim, a redução dos gradientes osmóticos em soluções hiposalinas promove o efeito de diluição intracelular do K^+ , porém, com reduzido comprometimento da integridade morfológica dos espermatozóides (Cosson *et al.*, 1999). O efeito de redução do gradiente osmótico foi demonstrado mediante atraso no início da motilidade dos espermatozóides de *Danio rerio*, seguido de aumento da intensidade de deslocamento, bem como do tempo total de motilidade (Wilson-Leedy *et al.* 2009).

Reconhecendo a ictioftiríase como um dos principais entraves para o cultivo do jundiá, estudos anteriores demonstraram que apenas os empregos de sal e de temperaturas elevadas podem ter efeito profilático satisfatório sem apresentar risco tanto para o manejo quanto para o consumo dos peixes tratados (Brandão, 2004; Carneiro *et al.*, 2005). O emprego de meio salino, sob concentração de NaCl entre 4 e 5‰, tem sido efetivo no combate à doença e demonstrado uma boa tolerância da espécie mesmo quando mantida sob exposição crônica de até duas semanas (Garcia *et al.*, 2007). Além disso, existem evidências de que o emprego de meios hiposalinos para a manutenção de espécies de água-doce pode levar a condição de conforto osmótico e redução do estresse, promovendo uma maior resistência do organismo à doenças infecciosas (Tsuzuki *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003).

4. CONCLUSÃO

O cultivo de jundiá sob salinidade até 6‰ de sal marinho não prejudica a qualidade espermática e ainda potencializa o sucesso de fecundação pelo aumento do tempo de motilidade. Assim, para fins de controle do protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* é aconselhável a produção de machos adultos em salinidades entre 2 e 6‰ de NaCl sem que haja perda na qualidade do gameta masculino.

5. BIBLIOGRAFIA

- ALAVI S. M. H., RODINA M., POLICAR T., KOZAK P., PSENICKA M. LINHART O. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, 68 276–283, 2007.
- BALDISSEROTO, B., RADÜNZ, J. R. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: BALDISSEROTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Editora UFSM, Santa Maria, 470p, 2005.
- BOBE, J., LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **Gen. Comp. Endocrinol.** (2009), doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011.
- BOIJINK, C.L., BRANDÃO, D.A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, 31(4): 687-690, 2001.
- BOITANO, S., OMOTO, K.C. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. **Journal of Cell Science**, 98: 346-349, 1991.
- BORGES A, SIQUEIRA DR, JURINITZ DF, ZANINI R, AMARAL F, GRILLO ML *et al*. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiol Biochem** 31:45–53, 2005.
- BRANDÃO, D.A. Profilaxia e doenças. In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. (Eds.). **Criação de Jundiá**. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 161–189, 2004.
- CARNEIRO, P.C.F., SCHORER, M., MIKOS, J.D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesq. Agropec. Bras.**, 40, 99–102, 2005.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International** 12: 69–85, 2004.
- COSSON, J., DREANNO, C., BILLARD, R., SUQUET, M. AND CIBERT, C. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (ed.), **The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications**. Cache River Press, pp. 161–186, 1999.
- GARCIA, L.O., BECKER, A.G., COPATTI, C.E., BALDISSEROTTO, B., RADÜNZ NETO, J. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **J. World Aquac. Soc.** 38, 1–11, 2007.
- GOMES, L.C., ARAUJO-LIMA, C.A.R.M., ROUBACH, R., URBINATTI, E.C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, 38, 283–290, 2003.
- MIRON, D.S., SILVA, L.V.F., GOLOMBIESKI, J.I, BALDISSEROTTO, B. Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, 14: 155-161, 2003.
- RURANGWA, E, KIME, D.E., OLLEVIER, F., NASH J.P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, 234, 1 –28, 2004.
- SOUZA-BASTOS, L. R., FREIRE, C. A. The Handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 289, 167-174, 2009.

TAKAI, H., MORISAWA M. Change in intracellular K concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *Journal of Cell Science* 108, 1175-1181, 1995.

TSUZUKI, M.Y., OGAWA, K., STRÜSSMANN, C.A., MAITA, M., TAKASHIMA, F. Physiological response during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. ***Aquaculture***, 200, 349–362, 2001.

WILSON-LEEDY, J.G., KANUGA M.K., INGERMANN R.L. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. ***Theriogenology*** 71, 1054–1062, 2009.