

**MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DO CURIMBATÁ,  
*Prochilodus lineatus* EM RELAÇÃO AO VOLUME E A TEMPERATURA  
DA SOLUÇÃO ATIVADORA**

Bruno Estevão de Souza, Eduardo Antônio Sanches, Diego Mendes Baggio,  
Robie Allan Bombardelli, Elizabeth Romagosa, E-mail:  
bruno\_bes@yahoo.com.br

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharia e Ciências  
Exatas - Toledo, PR.

**Palavras-chave:** machos, ativação, espermatozóides, diluição, peixe.

**Resumo:**

A motilidade espermática é um fator chave para a determinação da qualidade do sêmen e sua capacidade de fertilização. Vários fatores influenciam a motilidade espermática como: espécie estudada, qualidade dos gametas, tipo, volume, temperatura e pH da solução ativadora. Assim sendo, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito que a temperatura da solução ativadora e, a relação volume de sêmen:água exercem sob a duração da motilidade espermática. Foram utilizados 12 machos de curimbatá, *Prochilodus lineatus* com peso e comprimento padrão médio de  $405,83 \pm 134,20$  g,  $25,63 \pm 3,19$ cm, respectivamente. Os reprodutores receberam duas doses de extrato de hipófise de carpa (dose inicial de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  e final de  $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Do sêmen dos 12 machos foi realizado um "pool" e, analisada a concentração e o índice de sobrevivência espermática, bem como, a duração da motilidade espermática. Para o primeiro ensaio foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram compostos pelos volumes de sêmen provenientes do "pool" e a água nas proporções de: 1:1, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 e 1:100000SL, respectivamente. O segundo ensaio utilizou um delineamento experimental inteiramente casualizado os tratamentos foram constituídos por alíquotas de 5 $\mu$ L do "pool" de sêmen e, adicionadas a 200 $\mu$ L de solução ativadora nas seguintes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. A duração da motilidade espermática do curimbatá, *P. lineatus* teve um comportamento linear ascendente em função do aumento da diluição a partir de 1:2SL sêmen:água (23,04s), até atingir o valor máximo estudado que foi de 1:100.000SL sêmen:água, com a duração da motilidade espermática de 28,83s Os melhores resultados de duração da motilidade espermática em função da temperatura da solução ativadora foram obtidos à temperatura de 20°C, a qual proporcionou uma duração média da motilidade de  $22,51 \pm 0,79$  segundos.

## Introdução

O curimatá é um peixe bem consumido, principalmente nas cidades do interior paulista, devido ao maior percentual de captura e sabor de sua carne (Romagosa et al, 1985). Apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal de subsistência e esportiva, além de apresentar carne saborosa (Barbieri et al., 2004).

Dentre as espécies de peixes com potencial para a aquicultura, o curimatá apresenta boa perspectiva de criação em cativeiro. Porém, tratando-se de uma espécie que não se reproduz naturalmente em ambientes estanques, necessita de ser induzida à reprodução através do emprego de hormônios gonadotrópicos (Borsato da Silva, 2000).

Apesar da tecnologia da reprodução do curimatá estar praticamente dominada, há necessidade de alguns estudos relacionados com o método de fertilização artificial, a qualidade dos gametas e suas relações com o sucesso da fertilização artificial ainda devem ser realizados.

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais comuns e mais utilizados para se avaliar a qualidade dos espermatozoides. A simples estimativa visual do sêmen fresco, com auxílio de um microscópio é suficiente para avaliação parcial da qualidade do material fecundante (Kavamoto et al., 1986).

Muitos fatores influenciam a duração da motilidade espermática, tais como o protocolo utilizado, a espécie estudada, tipo, volume, pH e temperatura da solução ativadora sendo que estes fatores variam de espécie para espécie (Billard et al., 1995).

A diluição é um fator determinante na caracterização da motilidade espermática, sendo a concentração e o volume do diluente os desencadeadores da ativação do sêmen (Marques, 2001). Níveis insuficientes ou irregulares de diluição não permitem aferir precisamente a duração da motilidade espermática (Billard et al, 1995).

A diluição seminal é um fator chave para o sucesso da reprodução artificial de peixes, pois, influencia a performance da motilidade espermática (Alavi e Cosson, 2005) a qual esta diretamente ligada ao sucesso da fertilização (Alavi et al., 2007).

Billard e Cosson (1992) constataram que o aumento ou decréscimo da temperatura influencia diretamente à duração da motilidade espermática, causando maior ou menor atividade celular, levando ao aumento ou decréscimo do consumo das reservas energéticas dos espermatozoides (Alavi e Cosson, 2005).

Com intuito de conhecer o efeito que a solução ativadora pode causar sobre a duração da motilidade espermática do curimatá, *Prochilodus lineatus*, este experimento foi realizado em três fases: (1) definir a qualidade espermática do "pool" a ser utilizado no experimento; (2) avaliar os efeitos de diferentes relações de diluição do sêmen ou volume de sêmen:volume de água sobre a duração da motilidade espermática; e (3) definir a temperatura ideal da solução ativadora.

## **Materiais e Métodos**

O experimento foi realizado com reprodutores de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis - UNIOESTE, instalado no Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR, no mês de novembro de 2006.

Os peixes provenientes do Rio Paraná foram estocados durante o ano de 2005, no Centro de Pesquisa, em tanques escavados (em terra) de 200m<sup>2</sup> e, renovação de água somente para compensar a perda por evaporação e infiltração. Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada com 32% de PB, duas vezes ao dia, às 8:00hs e 17:00hs.

Foram selecionados dentro do próprio tanque 12 machos de curimatá que liberavam pequenas quantidades de sêmen sob leve pressão abdominal (Kavamoto et al., 1986a). Os animais selecionados foram transportados ao laboratório de reprodução.

Os reprodutores foram individualmente pesados, marcados e acondicionados em caixa d'água circular (1000L) e, renovação de água constante. Após este procedimento aplicou-se intraperitonealmente uma dose de 0,5mg de extrato de hipófise de carpa (EHC).kg de reprodutor<sup>-1</sup>. Doze horas após a primeira aplicação, foi aplicada uma segunda dose de 5mg EHC.kg de reprodutor<sup>-1</sup>. Após as aplicações a temperatura da água foi monitorada de hora em hora (Woynarovich e Horvath, 1983).

Os machos de curimatá, *P. lineatus* apresentaram valores médios de peso e comprimento padrão de 405,83 ± 134,20 g, 25,63 ± 3,19cm, respectivamente.

### *Fase 1: Qualidade espermática do “pool”*

A coleta dos gametas masculinos foi realizada após um período de 160 horas-grau ou unidades térmicas acumuladas (Woynarovich & Horvath, 1983). Os machos foram contidos e secos com panos e papel toalha e, aplicada massagem na região ventral do animal no sentido céfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação e, o restante foi com o auxílio de uma seringa descartável, com graduação de 0,1mL, para mensuração do volume de sêmen liberado e da produção relativa de sêmen (Bombardelli et al., 2006). O sêmen colhido dos 12 machos foi homogeneizado em um “pool” e armazenado sob resfriamento à 15°C.

Em seguida, foi mensurada a concentração espermática do sêmen. Para tanto, retirou-se uma amostra de 5µL de sêmen do “pool” descrito anteriormente, que foi diluído em 5mL de formol salina tamponado, resultando em uma diluição de 1:1000. Do material diluído e fixado anteriormente foi realizado o procedimento de contagem de células espermáticas em câmara hematimétrica de Neubauer (Mylonas et al., 1997).

Também, foi aferida a duração da motilidade espermática do “pool” de sêmen. Para a mensuração desta variável foi misturado 5µL de sêmen a 200µL de água e, concomitantemente a este evento, foi iniciada a contagem

do tempo necessário para que aproximadamente 50% dos espermatozoides perdessem o movimento. Esta avaliação foi realizada por meio de microscópio óptico em objetiva 40X.

Deste mesmo “pool” de sêmen foi determinado o índice de sobrevivência dos espermatozoides, a partir do método de coloração de nigrosina-eosina (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986). Para a mensuração do índice de sobrevivência, após a mistura e homogeneização do sêmen e os corantes, foram confeccionados dois esfregaço, em lâminas separadas. De cada lâmina foram contados pelo menos 400 espermatozoides, em microscópio de óptico (40x), sendo considerados vivos aqueles com coloração branca (impermeáveis ao corante) e, mortos, com vermelha ou rosada (permeáveis ao corante).

### *Fase 2: Efeito do volume do sêmen:volume de água na duração da motilidade espermática*

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por sete tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram compostos pelas relações entre volume de sêmen e volume de água empregada como solução ativadora de: 1:1, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 e 1:100000  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Foi considerada como uma unidade experimental um recipiente plástico de 200mL, contendo sêmen ativado pelos diferentes volumes de solução ativadora.

Simultaneamente, à homogeneização do sêmen e da solução ativadora foi realizada a mensuração do tempo de ativação espermática, conforme descrito anteriormente.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão à nível de 5% de significância. O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi *Statística*® (Statsoft, 2005).

### *Fase 3: Efeito da temperatura da solução ativadora na duração da motilidade espermática*

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos por alíquotas de 5 $\mu\text{L}$  do “pool” de sêmen (descrito anteriormente) e, adicionadas a 200 $\mu\text{L}$  de solução ativadora nas seguintes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C.

Após a mistura do sêmen e da solução ativadora foi mensurado o tempo de ativação espermática, conforme metodologia descrita anteriormente.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão à nível de 5% de significância. O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi o *Statística*® (Statsoft, 2005).

## Resultados e Discussão

### *Fase 1: Qualidade espermática do “pool”*

A tabela 1 expressa os valores médios da produção seminal, concentração espermática, motilidade espermática, sobrevivência espermática e produção relativa de sêmen dos machos.

**Tabela 1. Produção seminal e características seminais do “pool” de sêmen proveniente de 12 machos de curimatá, *Prochilodus lineatus*.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Produção seminal (mL)	0,51 ± 0,35
Concentração de espermática SPZ.mL-1)	2,95x10 <sup>10</sup> ± 2,0x10 <sup>9</sup>
Motilidade espermática (s)	23,47 ± 0,86
Sobrevivência espermática (%)	97,5 ± 0,07
Produção relativa de sêmen (mL.g-1)	0,0013 ± 0,0007

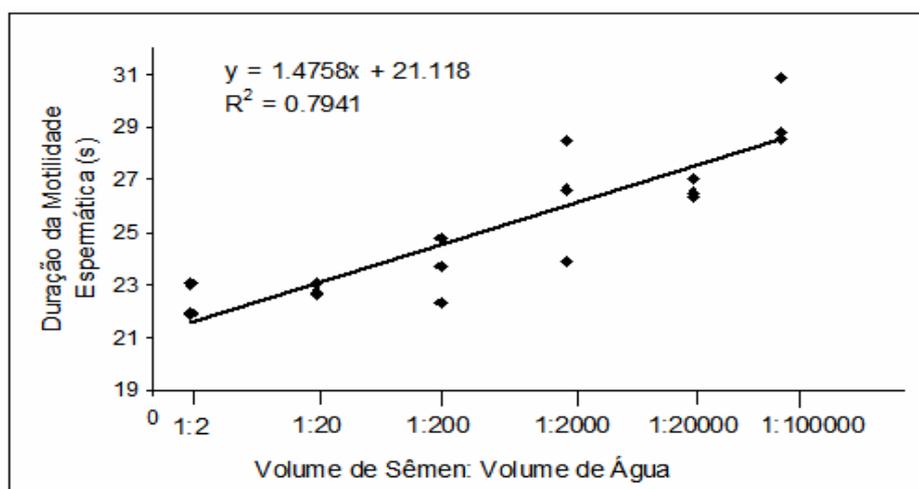
### *Fase 2: Efeito do volume do sêmen:volume de água na duração da motilidade espermática*

A Tabela 2 mostra os valores médios de duração da motilidade espermática do “pool” realizado com sêmen de 12 machos de curimatá, *P. lineatus* submetidos a diferentes relações de diluição durante o processo de ativação.

**Tabela 2. Valores médios de duração da motilidade espermática do “pool” de sêmen de 12 machos de *P. lineatus* submetido a diferentes relações de diluição durante o processo de ativação.**

<b>Relações entre os volume de sêmen:volume de água</b>	<b>Duração da motilidade espermática (s) ± DP</b>
1:100000	28,83 ± 1,27
1:20000	27,02 ± 0,33
1:2000	28,51 ± 2,31
1:200	23,72 ± 1,24
1:20	22,62 ± 0,22
1:2	23,04 ± 0,67
1:1	-----

Os valores de duração da motilidade espermática (s) e as diferentes relações de volume de sêmen:volume de água utilizadas na ativação dos espermatozoides de curimatá estão expressos na Figura 1.



**Figura 1. Duração da motilidade espermática do curimatá, *Prochilodus lineatus* utilizando-se diferentes relações de sêmen do volume de sêmen:volume de água para a ativação dos espermatozoides.**

Na menor diluição, 1:1µL sêmen:água não foi possível aferir a duração da motilidade espermática devido a não ativação de todos espermatozoides. Segundo Billard e Cosson (1992) é necessária uma diluição relativamente alta (acima de 1:1000) para que ocorra sincronizadamente a ativação de todos os espermatozoides.

Sob baixas diluições, não são ativados todos os espermatozoides e a ativação vai ocorrendo progressivamente por alguns minutos após a diluição. Este fato dificulta aferir corretamente a duração da motilidade espermática e pode explicar muitas discrepâncias encontradas na literatura (Billard et al., 1995).

Os resultados do presente experimento mostram uma relação diretamente proporcional ( $P < 0,05$ ) entre o tempo de ativação espermática e as relações de diluição seminal a partir do uso da água como solução ativadora (Figura 1).

A partir da diluição de 1:2µL sêmen:água (23,04s), a duração da motilidade espermática aumentou proporcionalmente com aumento da diluição até atingir o valor máximo estudado que foi de 1:100.000µL sêmen:água, com a duração da motilidade espermática de 28,83s.

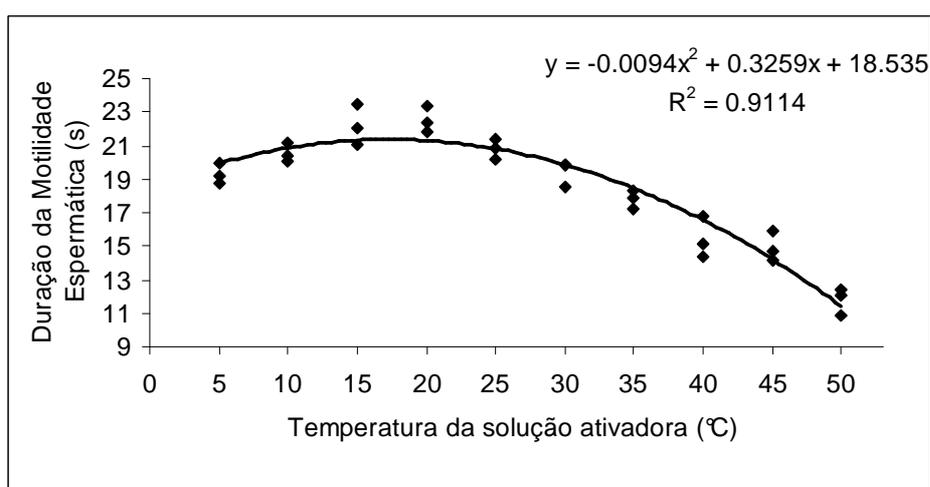
Outros autores também estudaram o efeito da diluição do sêmen sob a motilidade espermática. Alavi et al. (2007) avaliaram as diluições de 1:25, 1:50 e 1:100µL sêmen:diluyente para a *Perca fluviatilis*, encontrando os melhores resultados na diluição de 1:50µL sêmen:diluyente. Alavi e Cosson (2005) avaliaram as diluições de 1:10, 1:50 e 1:200µL sêmen:diluyente para o esturjão persa, *Acipenser persicu* encontrando os melhores resultados nas diluições de 1:50 e 1:200µL sêmen:diluyente. Gallis et al, (1991) que também estudaram o efeito da diluição sobre a motilidade espermática observaram um aumento na motilidade e na diluição de 1:6 para 1:100 para o esturjão siberiano, *Acipenser baeri*.

As espécies de peixes acima citados quando comparadas aos peixes tropicais como, por exemplo, o curimatá apresenta motilidade sob baixas

diluições devido às baixas concentrações de cátions inorgânicos no seu sêmen (Alavi et al., 2004).

### *Fase 3: Efeito da temperatura da solução ativadora na duração da motilidade espermática*

Os valores de duração da motilidade espermática (s), utilizando-se água como solução ativadora em diferentes temperaturas na ativação dos espermatozoides de curimatá, *P. lineatus* podem ser vistos na Figura 2.



**Figura 2. Duração da motilidade espermática dos espermatozoides de curimatá, *P. lineatus* ativados, utilizando-se água em diferentes temperaturas.**

Os resultados de duração da motilidade espermática apresentaram um comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com máximo desempenho teórico em termos de tempo de motilidade espermática para a temperatura de  $17,34^{\circ}\text{C}$ , promovendo uma duração da motilidade espermática de  $21,36\text{s}$  (Figura 2).

A duração da motilidade espermática de *P. lineatus* aumentou proporcionalmente à temperatura da solução ativadora, a partir dos  $5^{\circ}\text{C}$  ( $19,34\text{s}$ ) alcançando o ponto máximo aos  $20^{\circ}\text{C}$  ( $22,51\text{s}$ ), depois, estes valores diminuem e passam a ter um comportamento inversamente proporcional ao aumento dos valores de temperatura da solução ativadora aos  $50^{\circ}\text{C}$  ( $11,77\text{s}$ ).

Este comportamento da duração da motilidade ocorrer inversamente proporcional ao aumento da temperatura também foi registrado por Billard e Cosson (1992) para a truta arco-íris, Vladic e Jarvi (1997) para truta parda e salmão do Atlântico por Jezierska e Witeska (1999) para carpa comum e prateada e por Williot et al., (2000) para esturjão siberiano.

Segundo Billard e Cosson (1992) o aumento ou decréscimo da temperatura da solução ativadora tem influência direta na duração da motilidade espermática. Isto se deve ao fato que, à reserva energética dos espermatozoides dos peixes é limitada e conseqüentemente, o aumento da atividade celular espermática causado pelo aumento da temperatura da

solução ativadora induz à uma redução na duração da motilidade espermática. Entretanto, uma redução na temperatura da solução ativadora resultará em um aumento da duração da motilidade espermática em função também, da redução no metabolismo celular dos espermatozoides (Alavi e Cosson, 2005).

Existem muitos outros fatores que influenciam a duração da motilidade espermática como a espécie estudada, a qualidade dos gametas, o tipo, volume e pH da solução ativadora e o protocolo utilizado, sendo que estes fatores ainda variam de espécie para espécie (Billard et al., 1995).

## Conclusões

A razão de diluição que proporcionou a maior duração da motilidade espermática do sêmen do curimatá, *P. lineatus* foi de 1:100.000µL sêmen:água, com a duração da motilidade espermática de 28,83s.

A temperatura da solução ativadora que proporcionou a maior duração da motilidade espermática do curimatá, *P. lineatus* foi de 20°C, a qual proporcionou uma duração média da motilidade de 22,51 ± 0,79 segundos.

## Referências

- Alavi, S. M. H.; Cosson, J.; Karami, M.; Amiri, B. M.; Akhoundzadeh, M. A. (Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality) *Reproduction* 2004, 128, 819–828.
- Alavi, S. M. H. e Cosson, J. (Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review) *Cell Biology International*, 2005, 29, 101–110.
- 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*, 2007, 68, 276–283.
- Barbieri, G.; Salles, F. A.; Cestarolli, M. A.; Teixeira-Filho, A. T. (Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga) *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 2004, 26, 2, 169-174.
- Billard, R. e Cosson, M. P. (Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish) *J. Exp. Zoo.*, 1992, 261, 122-131.
- Billard, R.; Cosson, M. P.; Perchee, G.; Linhart, O. (Biology of sperm and artificial reproduction in carp) *Aquaculture*, Amsterdam, 1995, 129, 95-112.
- Bombardelli, R. A.; Mörschbacher, E. F.; Campagnolo, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2006, 35, 4, 1251-1257.

Borsato Da Silva, E. (Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1836)). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 58p. Dissertação (Mestrado em aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

Gallis J. L.; Fedrigo, E.; Jatteau, P.; Bonpunt, E.; Billard R. (Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility.) In: Williot P, editor. *Acipenser*. Bordeaux: *Cemagref*, 1991, 143-51 p.

Jeziarska B. e Witeska M. (The effect of time and temperature on motility of spermatozoa of common and grass carp) *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries*, 1999, 2, 2. Available Online: <http://www.ejpau.media.pl/series/volume2/issue2/fisheries/art-04.html>  
Acessado: Sexta-feira, 21 de setembro de 2007.

Kavamoto, E. T. e Fogli DA Silveira, W. (Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hylarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo) *Boletim do Instituto de Pesca*, 1986, 13, 1, 95-100.

Kavamoto, E. T.; Fogli DA Silveira, W.; Godinho, H. M. (Características seminais do curimatã *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881) *Boletim do Instituto de Pesca*, 1986a, 13, 2, 45-50.

Mylonas, C. C.; Gissis. A.; Magnus, Y. et al. (Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRH $\alpha$  delivery system) *Aquaculture*, 1997, 153, 301-311.

Romagosa, E.; Narahara, M. Y.; Godinho, H. M. (Tipo de desova do curimatã, *Prochilodus scrofa* Steind. 1881, do rio Mogi-Guaça, Pirassununga, São Paulo) *Boletim do Instituto de Pesca*, 1985, 12, 4, 1-5.

STASOFT. INC. (Statística (data analysis software system)) Version 7.1. *Tulsa, USA*, 2005.

Vladic, T. e Jarvi, T. (Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout—the effect of water temperature) *Journal of Fish Biology*, 1997, 50 1088-1093.

Williot, P.; Kopeika, E. F.; Goncharov, B. F. (Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt)) *Aquaculture*, 2000, 189, 53-61.

Woynarovich, E.; Horvath, L. (A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão) Brasília: *Escopo*. Tradução de Vera Lucia Mixtra Chama de “The Artificial Propagation of Warm - Water Fin fishes – A Manual for Extension”. 1983, 220 p.