

Utilização do espermátócrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*)

Eduardo SHIMODA^{1,2,3}
 Dalcio Ricardo de ANDRADE²
 Manuel Vazquez VIDAL JUNIOR²
 George Shigueki YASUI⁴
 Hugo Pereira GODINHO⁵
 José Frederico Straggiotti SILVA²
 Guilherme SOUSA^{2,6}

1 - Faculdade de Castelo, Castelo-ES
 2 - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ
 3 - Universidade Candido Mendes, Campos dos Goytacazes-RJ
 4 - Hokkaido University – Hakodate campus – Japan
 5 – PUCMinas, Belo Horizonte-MG
 6 - Projeto Piabanha, Itaocara-RJ

Correspondência para:

Eduardo Shimoda
 Rua Dr. Lacerda Sobrinho, 246 – casa 15
 Centro, 28.010-077 – Campos dos Goytacazes – RJ
 e-mail: eduardo_shimoda@uol.com.br

Recebido para publicação: 21/10/2005
 Aprovado para publicação: 23/08/2007

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da utilização do espermátócrito para estimar a concentração espermática do sêmen de piabanha. Os exemplares (n=29) de piabanha *Brycon insignis* foram hipofisados, sendo posteriormente realizada a coleta de sêmen. O espermátócrito foi determinado utilizando-se micro-centrífuga de tubos capilares. A concentração espermática foi verificada por contagem em câmara de Neubauer, após diluição. A concentração espermática verificada (média±desvio padrão) foi de $24,38 \pm 3,84 \times 10^9$ espermatozoides / mL, e o espermátócrito foi de $16,14 \pm 5,20$ %. A equação de regressão: $\hat{Y} = 14,01.10^9 + 0,6428.10^9.X$ foi significativa ($P < 0,01$) e apresentou R^2 ajustado = 0,75. Deste modo, é possível estimar a concentração através da determinação do espermátócrito.

Palavras-chave:

Concentração espermática.
 Espermátócrito.
 Análise seminal.
 Piabanha.

Introdução

A piabanha *Brycon insignis* é uma espécie de peixe considerada ameaçada de extinção¹ e encontrada, naturalmente, apenas na bacia do rio Paraíba do Sul aonde a população vem diminuindo rapidamente em função de ações antropogênicas. Estudos a respeito da biologia reprodutiva e o desenvolvimento de métodos de desova artificial tem se intensificado nos últimos anos.²

Assim, a determinação da concentração espermática constitui importante passo para a otimização do sêmen em processos de desova induzida, evitando-se utilização de mais de 314.481 espermatozoides por ovócito, considerada a proporção ótima de gametas para a piabanha, acima da qual não ocorreriam aumentos no percentual de fertilização.³

Dentre as várias espécies de peixe existentes no país, algumas já foram estudadas quanto à concentração

espermática, sendo relativamente alta a variação intra e interespecífica. Na família Characidae, foram determinadas as concentrações espermáticas (espermatozoides x 10^9 por mL) da própria piabanha *B. insignis*⁴ (24,4 – 25,14), do pacu Pacu *Piaractus mesopotamicus*⁵ (31,7 – 43,15) e do dourado *Salminus maxillosus*⁶ (4,3 – 10,86).

Em relação aos métodos que permitem a determinação do número de espermatozoides por mL de sêmen, o mais comum é a contagem em câmara hematómetrica de Neubauer. Este procedimento foi utilizado por diversos autores no Brasil^{4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14} e em outros países^{15,16,17,18,19,20,21}. A utilização da câmara de Neubauer, entretanto, apresenta alguns inconvenientes, como a necessidade de esperar a precipitação dos espermatozoides e a realização de altas diluições, o que pode incorrer em erros.¹⁰

Métodos alternativos têm sido propostos, podendo-se citar a contagem na câmara de Makler^{9,10,18}, a espectrofotometria^{11,15} e o

espermatócrito^{9,12,15}.

Foram obtidas correlações significativas ($P < 0,0001$) entre a concentração espermática e o espermatócrito, nas espécies *Oncorhynchus mykiss* ($R^2 = 95,5\%$), *Coregonus clupeaformis* ($R^2 = 79,1\%$) e *Perca flavescens* ($R^2 = 95,8\%$).¹⁵ De forma semelhante, a regressão entre os parâmetros revelou-se significativa ($P < 0,05$) nas espécies *Prochilodus scrofa*¹², *Rhamdia hilarii*⁸ e *Oncorhynchus mykiss*²². Em contraste, na espécie *Scophthalmus maximus*, não foi obtida correlação significativa.¹⁹

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de utilização do espermatócrito para estimar a concentração espermática da piabanha, bem como verificar a influência do peso e do comprimento-padrão sobre a concentração e o espermatócrito.

Material e Método

Exemplares da espécie *Brycon insignis*, pertencentes à Estação Experimental do Projeto Piabanha, localizado no Município de Itaocara – RJ, foram cultivados em tanques com aproximadamente 600 m² e densidade de estocagem de 800g de peixe/m² de lâmina d'água, recebendo ração extrusada, a uma proporção de 3% do peso vivo/dia, até atingirem maturidade sexual com 2 ou 3 anos de idade. Os experimentos transcorreram durante a estação natural de reprodução, entre os meses de outubro de 2002 e fevereiro de 2003.

Os peixes foram capturados dos tanques externos de cultivo, sendo os machos que apresentaram elevado grau de maturação (vertência de sêmen sob compressão abdominal) selecionados e transportados até o laboratório, onde foi procedida a biometria (medição do peso e comprimento-padrão) dos animais. Os exemplares utilizados apresentaram peso médio de 229,03 g e comprimento médio de 25,66 cm.

A seguir, procedeu-se a hipofiseção, segundo descrito por Woynarovich e Horvath²³, utilizando-se 0,5mg de extrato bruto pituitário de carpa/kg PV, sendo,

então, os exemplares colocados em um tanque interno do laboratório, na presença de fêmeas.

O sêmen foi extrusado 240 horas-graus após a hipofiseção, através de massagem abdominal no sentido ântero-posterior, sendo coletado em tubos de 5 mL para posterior análise. 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. A contaminação foi verificada observando-se uma gota de sêmen ao microscópio óptico, em aumento de 400x. Amostras que apresentaram motilidade, sem adição de solução ativadora, foram descartadas.

Para determinação da concentração espermática, as amostras seminais, coletadas a partir de 29 exemplares de piabanha, foram diluídas (1:1000) em 20 mL de solução de formol-salina²⁴, utilizando-se uma pipeta automática (0,02 mL). As amostras foram mantidas em local fresco e sombreado, sendo a análise realizada no dia seguinte à coleta. A contagem foi realizada em câmara hematómica de Neubauer “improved” ao microscópio com aumento de 400 vezes.¹¹ Foram contados os espermatozoides presentes em 5 dos 25 quadrados de 0,04mm² (volume = 0,004mm³, uma vez que a altura é de 0,1mm). O resultado foi convertido para concentração, em espermatozoides por mL, multiplicando-se o número de espermatozoides contados nos 5 quadrados por 5x10⁷.

O espermatócrito foi determinado a partir das amostras (não diluídas) dos mesmos 29 exemplares de piabanha, sendo a análise realizada ato imediato à coleta. Aliquotas de sêmen foram coletadas em tubos capilares de 75mm e analisadas em micro-centrífuga portátil Bayer Diagnostics, equipada com um rotor de tubos capilares a 4430 g, durante 15 min, sendo o resultado expresso em percentagem de volume ocupado pelo precipitado em relação ao volume total.¹⁵

A equação de regressão, entre os parâmetros espermatócrito x concentração,

teve sua significância testada pelo teste F^{25} . Foram avaliados, ainda, os efeitos do peso e do comprimento-padrão sobre os parâmetros concentração espermática e espermatócrito. Uma vez que os valores das variáveis peso, comprimento-padrão, concentração espermática e espermatócrito apresentaram distribuição gaussiana, conforme verificado pela aplicação do teste aderência Kolmogorov-Smirnov, foram obtidas as médias, desvios-padrão, limites de confiança ($P < 0,05$) e coeficientes de variação destes parâmetros. As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas.

Resultados e Discussão

Os dados individuais, médias, medidas de dispersão (desvio-padrão, coeficiente de variação) e limites de confiança relacionados à biometria, à concentração espermática e ao espermatócrito da piabanha podem ser observados na tabela 1.

No experimento realizado, as concentrações mínima e máxima, em espermatozoides (sptz) $\times 10^9$ / mL, foram de 22,9 e 25,8, respectivamente. Esta variação foi próxima à obtida em outro trabalho⁴, pesquisando também com a piabanha⁴ (24,4 a 25,1 sptz $\times 10^9$ /mL), porém, menor do que a verificada em outros caracídeos, como o pacu⁵ (31,7 a 43,1 sptz $\times 10^9$ /mL) e o dourado⁶ (4,3 – 10,8

sptz $\times 10^9$ /mL), bem como na maioria das espécies brasileiras de água doce^{6,7,8,9}. Possivelmente, a variação relativamente baixa nas concentrações espermáticas verificadas neste trabalho foi em função da homogeneidade do grau de maturidade da maioria dos exemplares, ao contrário do que pode ter ocorrido em outras espécies. Nas estações de piscicultura, é comum, durante a seleção de reprodutores que serão submetidos à indução hormonal, encontrarem-se vários exemplares vertendo sêmen mediante massagem abdominal. Entretanto, estes peixes, considerados maduros, muitas vezes podem não estar no ápice da produção espermátogênica. No Brasil, foram realizadas coletas periódicas de sêmen da *Cyprinus carpio*, durante 71 dias, sendo obtida uma regressão cúbica entre os parâmetros volume de sêmen e dia de coleta ($P < 0,01$)¹³. Em outro estudo²⁰, também envolvendo a *C. carpio*, foi observado que o volume de sêmen aumenta até o 48º dia na estação reprodutiva, declinando em seguida.

O valor médio de concentração espermática (tabela 1), obtido no sêmen dos peixes hipofisados, de $24,38 \times 10^9$ espermatozoides/mL, foi muito próximo ao da concentração de $24,76 \times 10^9$ espermatozoides/mL, verificado em piabanhas não hipofisadas pesquisadas por outros autores.⁴

O espermatócrito, por outro lado, apresentou coeficiente de variação (C.V. = 32%) relativamente alto (Tabela 1). A

Tabela 1 - Dados individuais, médias (X), desvios-padrão (S), coeficientes de variação (C.V.), e intervalos de confiança (I.C. – $P < 0,05$) da biometria (peso e comprimento-padrão), da concentração espermática e do espermatócrito do sêmen do *Brycon insignis* (piabanha) hipofisado, Estação Experimental do Projeto Piabanha, Itaocara – RJ – outubro de 2002 – fevereiro de 2003

Parâmetro	X	s	C.V. (%)	I.C. ($P < 0,05$)
Peso (g)	229	26,36	11,51	-
Comprimento-padrão (cm)	25,7	1,47	5,73	-
Concentração espermática ($\times 10^9$ sptz*/mL)	24,38	3,84	15,74	22,92 - 25,84
Espermatócrito (%)	16,14	5,2	32,23	14,16 - 18,12

* sptz = espermatozoides.

explicação para este coeficiente de variação talvez seja a presença de algumas células da linhagem germinativa que não os espermatozoides, como por exemplo espermatídes. Embora não tenham sido quantificadas, as espermatídes puderam ser observadas ao microscópio quando da contagem em câmara de Neubauer. Na determinação microscópica da concentração foram contados exclusivamente dos espermatozoides, enquanto que o espermatócrito é medido em função do volume proporcional das frações precipitadas na centrifugação. Este fato tem especial importância quando se considera que as espermatídes têm volume significativamente maior e sua presença poderia alterar bastante o espermatócrito.

No que se refere a relação entre concentração espermática e espermatócrito, a figura 1 mostra que os dois parâmetros se relacionam intimamente. Percebe-se que, de forma geral, quanto maior a concentração espermática, maior o espermatócrito.

A partir dos valores de concentração espermática e espermatócrito foi obtida a seguinte equação de regressão:

$$\hat{Y} = 14,01.10^9 + 0,6428.10^9.X$$

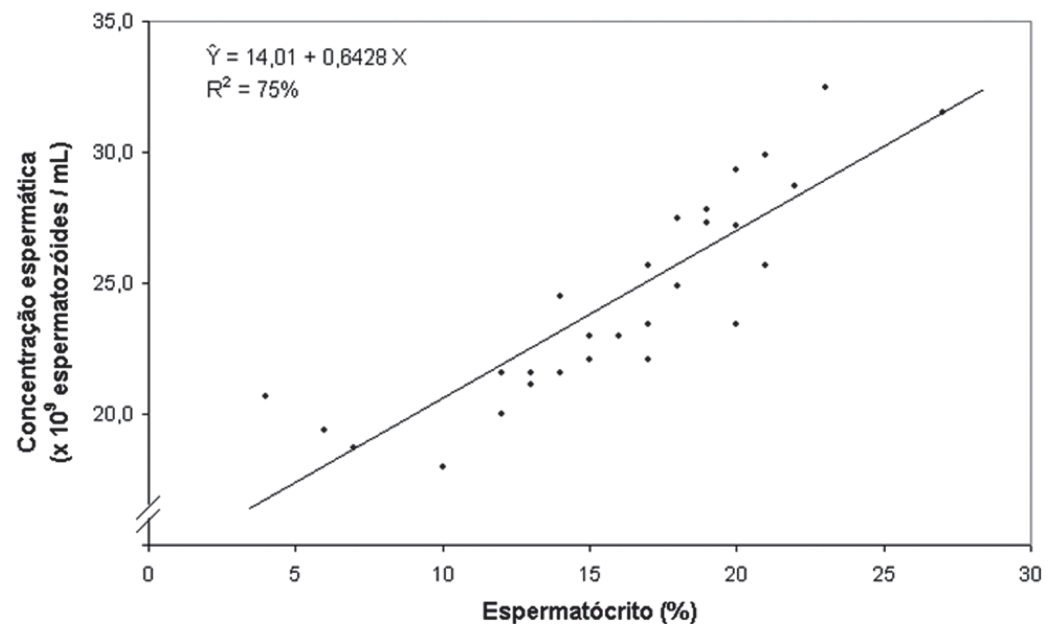


Figura 1 - Concentração espermática e espermatócrito obtidos a partir da piabanha *Brycon insignis* hipofisada (n = 29)

Onde:

\hat{Y} = Concentração estimada (sptz/mL)

X = Espermatócrito (%)

A regressão foi significativa ($P < 0,01$) e mostrou alto coeficiente de determinação ($R^2 = 75\%$), o que evidencia a relação entre os dois parâmetros. É possível, portanto, estimar a concentração espermática a partir da obtenção do espermatócrito.

Este resultado encontrado corrobora outras pesquisas¹⁵, que verificaram a possibilidade da estimativa da concentração a partir do espermatócrito de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, sendo o coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 95,5\%$) superior ao verificado neste experimento ($R^2 = 75\%$). No Brasil, também foi possível estabelecer a correlação para a espécie *Prochilodus scrofa*, cuja equação de regressão apresentou $R^2 = 95\%$.¹²

Embora o coeficiente de determinação obtido no presente trabalho tenha sido inferior ao verificado nas espécies anteriormente citadas, o valor corrobora ao verificado em outro trabalho²² com *O. mykiss*, em que foi obtido $R^2 = 0,75$.

Por outro lado, no turbot *Scophthalmus*

maximus, não foi obtida correlação significativa entre os parâmetros concentração espermática e espermatócrito.¹⁹ Provavelmente, isto se deveu ao fato de que espermátides são freqüentemente observadas em amostras seminais da espécie ao início do período de espermição. Embora a presença de espermátides tenha sido observada no presente estudo, a quantidade mostrou-se reduzida, já que a maioria dos peixes utilizados encontrava-se em meio à estação reprodutiva, sendo, inclusive, verificadas fêmeas no estágio de maturação avançada.

Nenhuma das demais correlações testadas, entre peso x concentração, peso x espermatócrito, comprimento-padrão x concentração e comprimento-padrão x espermatócrito, foi significativa ($P > 0,05$). Este resultado corrobora outros dois experimentos, que não verificaram influência do peso dos peixes sobre a concentração espermática do turbot *Scophthalmus maximus*²¹ e da truta *Oncorhynchus mykiss*¹⁴. Cabe ressaltar que, neste trabalho, os peixes apresentaram portes semelhantes, haja visto, os baixos coeficientes de variação observados no peso,

de 11,5%; e no comprimento-padrão, de 5,7%.

Conclusões

A concentração espermática da piabanha (média = $24,38 \times 10^9$ espermatozoides/mL) apresenta baixa variação entre indivíduos (CV = 15,7%), enquanto que o espermatócrito (média = 16,14%) é mais variável (CV = 32,2%).

A equação de regressão: $\hat{Y} = 14,01.10^9 + 0,6428.10^9 X$ revelou-se significativa ($P < 0,01$; $R^2 = 75,9\%$), sendo possível, a partir do espermatócrito (X), em %, estimar a concentração espermática (\hat{Y}), em espermatozoides/mL, do sêmen de piabanha.

O peso, na faixa de 184g a 297g, e o comprimento-padrão, na faixa de 22cm a 28cm, da piabanha não têm influência sobre a concentração espermática ou sobre o espermatócrito.

Agradecimentos

Ao CNPq/FAPERJ pelo financiamento.

Use of spermatocrit to estimate sperm concentration of semen from piabanha (*Brycon insignis*)

Abstract

The aim of this work was to determine the viability of spermatocrit use in Piabanha's sperm concentration estimation. Gametogenesis of piabanha *Brycon insignis* (n=29) was induced with crude pituitary extract of carp and semen was further collected. The spermatocrit was determined using capillary tube micro-centrifuge. The sperm concentration was verified by counting in "Neubauer chamber", after dilution. The verified sperm concentration (mean \pm standard deviation) was $24,38 \pm 3,84 \times 10^9$ spermatozoa/mL, and the spermatocrit was $16,14 \pm 5,20$ %. The regression model: $v = 14,01.10^9 + 0,6428.10^9.X$ was significant ($P < 0,01$) and presented adjusted $R^2 = 0,75$. Thus, the estimation of sperm concentration using the spermatocrit is possible.

Key words:

Sperm concentration. Espermatócrito. Seminal analysis. Piabanha.

Referências

1 BRASIL. Instrução Normativa Nº 5, de 21 de Maio de 2004. Reconhece espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 102, 23 maio 2004. Seção 1, p. 136-142.

2 SOUSA, G. **Indução à desova, ontogenia inicial, etologia larval e alevinagem da piabanha (*Brycon insignis* Steindachner, 1877)**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2004.

3 SHIMODA, E. et al. Determinação da razão ótima de

- espermatózoídes por ovócito da piabanha *Brycon insignis*. In: SIMPÓSIO MERCOSUL DE AQUICULTURA – AQUIMERCO, 2004, Vitória. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática – Aquabio, 2004. p. 212.
- 4 ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 2, p. 149–154, 2001.
- 5 SHIMODA, E. **Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 1999. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 1999.
- 6 GODINHO, H. P.; CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 16-25.
- 7 SHIMODA, E. et al. Influência da presença da fêmea sobre as características seminais do curimatá (*Prochilodus marginatus* Walbaum, 1972) **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 39-42, 1997.
- 8 KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, F. W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.
- 9 RIBEIRO, R. I. M. A. **Criopreservação do sêmen do piau-açu *Leporinus macrocephalus* (Garavello e Britski, 1998)**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- 10 TAITSON, P. F.; GODINHO, H. P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 238-239, 2003.
- 11 SILVEIRA, W. F. et al. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatózoídes na truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 14, p. 69-73, 1987.
- 12 KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; GODINHO, H. M. Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 13, n. 2, p. 45-50, 1986.
- 13 OLIVEIRA, J. C. F.; BARNABE, V.H.; SILVEIRA, W. F.; SOARES, H. A.; FREITAS, E. A. N.; KAVAMOTO, E. T. Características seminais da carpa *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science.**, v. 28, n. 1, p. 81-87, 1991.
- 14 KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A.; CAMPOS, B. E. S. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 14, p. 51-62, 1987.
- 15 CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, v. 109, p. 367-373, 1993.
- 16 FAUVEL, C. et al. La reproduction du turbot (*Scophthalmus maximus*): aspects biologiques et gestion des reproducteurs. **Bulletin Francais De Pisciculture : Ichthyobiologie Et Hydrobiologie Appliquees**, v. 112, p. 23-39, 1993.
- 17 BILLARD, R.; BRETON, B.; JALABERT, B. La production spermatogénétique chez la truite. **Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 11, n. 2, p. 199-222., 1971.
- 18 LAHNSTEINER, F. et al. Determinations of semen quality of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasm parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture Research**, v. 27, p. 163-181, 1998.
- 19 SUQUET, M. et al. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. **Aquatic Living Resources**, v. 7, p. 283-294, 1994.
- 20 CLEMENS, H. P.; GRANT, F. B. The seminal thinning response of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) after injections of pituitary extracts. **Copeia**, v. 2, p. 174-177, 1965.
- 21 SUQUET, M. et al. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of female on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus*. L. **Aquaculture and Fisheries Manage**, v. 23, p. 217-225, 1992.
- 22 KAVAMOTO, E. T. et al. Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 3, p. 73-81. 1985.
- 23 WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília: FAO/ CODEVASF/CNPq, 1983. 200 p.
- 24 HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 76, p. 84-97, 1957.
- 25 PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14 ed. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477 p.