

# **EFEITOS DE DIFERENTES OSMOLARIDADES SOBRE A INTEGRIDADE DE MEMBRANA EM ESPERMATOZOIDES RESFRIADOS DE *Jenynsia multidentata***

**BOTELHO, Joziel Gonçalves; SILVA, Janaina Camacho; CORCINI, Carine Dahl; COLARES, Elton Pinto; CALDAS, Jôsie Schwartz; FREITAS, Clarissa. VARELA JR, Antonio sergio Joziel\_bt@hotmail.com**

**Evento: Congresso de iniciação científica  
Área do conhecimento: Reprodução animal**

**Palavras-chave:** osmorregulação; sêmen; diluentes

## **1 INTRODUÇÃO**

Tanto o resfriamento quanto a criopreservação de gametas necessitam de uma solução diluidora adequada para cada espécie. Tal solução deve conter componentes essenciais e uma osmolaridade adequada. A osmolaridade adequada é fundamental para o sucesso na técnica de resfriamento celular, pois previne o choque osmótico, auxilia na imobilização da motilidade e diminuição do metabolismo celular. No entanto, não existem estudos sobre os efeitos da pressão osmótica na qualidade do esperma da espécie *Jenynsia multidentata*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes osmolaridades (240-460 mOsm / kg) sobre o parâmetro de integridade de membrana de *J. multidentata*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

*Jenynsia multidentata* é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul e sua população está em declínio em muitos ambientes, principalmente na região da Argentina (Hued e Bistoni 2005). Na preservação de células em curto prazo, alguns fatores como: pH, temperatura, osmolaridade, podem alterar não só as estruturas celulares como também a motilidade, segundo Alavi e Cosson(2006).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS (ou PROCEDIMENTO METODOLÓGICO)**

Foram utilizados machos, adultos, de *Jenynsia multidentata* (n=30). Os peixes foram aclimatados durante 15 dias sob condições ambientais constantes: água potável (salinidade 0) sem cloro, pH 7,0, aeração constante, temperatura de 26° C, um fotoperíodo de 12/12h claro/escuro. Os animais foram alimentados diariamente, ad libitum, com ração comercial para peixes onívoros. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande aprovou (CEUA-FURG)

Após o período de aclimação, os peixes foram anestesiados com benzocaína 0,1 gL<sup>-1</sup> por imersão em solução tamponada a pH 7,0 e imediatamente sacrificados. Após a incisão abdominal ocorreu à coleta de gônadas, estas foram colocadas em tubos Eppendorfs de 1,5 ml contendo o diluente HBSS em diferentes osmolaridades (240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 460 mOsm/kg). As suspensões contendo esperma foram mantidas refrigeradas a 5° C.

A avaliação de integridade de membrana ocorreu no sêmen fresco de 10 min após a diluição em HBSS a diferentes osmolaridades e a cada 24h tendo duração de 4 dias. Para avaliar a integridade da membrana plasmática, foram usados dois

fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio afim de verificar membranas integras e danificadas. A percentagem (0-100%) de células com membranas intactas foi determinada pela proporção de células que emitem fluorescência verde, de um total de 200 células.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando software Statistix 9.0. A normalidade dos dados foi analisada com o teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados são apresentados como não paramétricos, é realizada uma análise de variância de Kruskal-Wallis seguido por um teste de Duncan. Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão (SEM) com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

#### 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Integridade da membrana plasmática (%) de *Jenynsia multidentata* expostos a diferentes osmolaridades (240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 460 mOsm / kg) durante 4 dias: média ( $\pm$  erro padrão). Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas dentro do mesmo tempo experimental ( $P < 0,05$ ).

| Osmolality<br>(mOsm/Kg) | Plasma membrane integrity (%) |                     |                     |                      |                       |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|                         | 0 day                         | 1 day               | 2 days              | 3 days               | 4 days                |
| 240                     | 80.3 $\pm$ 1.3 (c)            | 82.3 $\pm$ 4.1 (b)  | 49.0 $\pm$ 11.4 (b) | 47.3 $\pm$ 9.8 (c)   | 24.3 $\pm$ 5.5 (d)    |
| 260                     | 89.0 $\pm$ 1.5 (c)            | 83.6 $\pm$ 1.6 (ab) | 66.0 $\pm$ 3.9 (b)  | 56.0 $\pm$ 4.6 (c)   | 59.0 $\pm$ 1.2 (bcd)  |
| 280                     | 88.0 $\pm$ 1.9 (c)            | 89.3 $\pm$ 1.9 (ab) | 80.3 $\pm$ 5.8 (ab) | 75.6 $\pm$ 2.5 (abc) | 64.0 $\pm$ 5.7 (abcd) |
| 300                     | 90.6 $\pm$ 1.6 (bc)           | 92.3 $\pm$ 1.6 (ab) | 86.0 $\pm$ 1.7 (ab) | 78.0 $\pm$ 0.6 (abc) | 77.5 $\pm$ 4.7 (abc)  |
| 320                     | 86.0 $\pm$ 3.8 (bc)           | 90.0 $\pm$ 0.3 (ab) | 90.6 $\pm$ 1.9 (a)  | 82.3 $\pm$ 3.3 (ab)  | 85.0 $\pm$ 1.1 (ab)   |
| 340                     | 90.6 $\pm$ 2.2 (bc)           | 93.6 $\pm$ 0.6 (a)  | 93.6 $\pm$ 0.6 (a)  | 86.3 $\pm$ 1.0 (a)   | 73.2 $\pm$ 5.0 (abc)  |
| 360                     | 92.6 $\pm$ 0.9 (abc)          | 89.0 $\pm$ 2.7 (ab) | 74.3 $\pm$ 7.6 (ab) | 84.7 $\pm$ 1.8 (a)   | 87.6 $\pm$ 2.3 (a)    |
| 380                     | 97.0 $\pm$ 0.6 (ab)           | 93.0 $\pm$ 1.0 (ab) | 89.0 $\pm$ 1.9 (ab) | 69.0 $\pm$ 7.8 (abc) | 58.0 $\pm$ 8.6 (abcd) |
| 400                     | 93.6 $\pm$ 0.2 (abc)          | 90.6 $\pm$ 1.6 (ab) | 77.3 $\pm$ 5.1 (ab) | 60.0 $\pm$ 3.8 (c)   | 54.0 $\pm$ 5.6 (bcd)  |
| 460                     | 99.0 $\pm$ 0.5 (a)            | 92.3 $\pm$ 1.2 (ab) | 77.0 $\pm$ 4.8 (ab) | 60.3 $\pm$ 5.7 (bc)  | 53.0 $\pm$ 6.0 (cd)   |

No sêmen fresco a integridade de membrana foi maior em HBSS 460, porém essa não diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) de HBSS 400, HBSS 380, HBSS360 mOsm/kg. Já ao longo dos 4 dias de exposição as amostras entre 290 à 380 mOsm/kg obtiveram os melhores resultados e não apresentaram diferenças significativas entre si.

#### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo de 4 dias a osmolaridade entre 290 à 380 mOsm/kg tiveram resultados mais promissores sobre o parâmetro de integridade de membrana plasmática, porém deve se considerar outros parâmetros tal como: motilidade espermática, integridade de DNA, atividade mitocondrial, para definir qual a osmolaridade mais adequada para preservação de sêmen de *J. multidentata* a curto prazo.

#### REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International, v. 30, n. 1, p. 1–14.
- HUED, A. C; BISTONI, M. A. 2005. Development and validation of a biotic index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. Hydrobiologia 543:279-298.