

Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores

SÊMEN OF PACU (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*) SUBMITTED THE FREEZING THROUGHOUT THE TIME WITH DIFFERENT WAYS EXTENDERS

Danilo Pedro Streit Jr. - (UFRGS)
Ricardo Pereira Ribeiro - (PPZ/UEM)
Gentil Vanini de Moraes - (PPZ/UEM)
Lauro Daniel Mendez Vargas - (PPZ/UEM)
Melaine Digmayer - (PPZ/UEM)
Juliana Minardi Galo - (PPZ/UEM)
Jayme Aparecido Povh - (PPZ/UFTM)
José Braccini Neto - (UFRGS)

RESUMO

Sêmen de 12 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) foram diluídos, resfriados a 5°C e avaliados até 120 horas, em cinco meios com o crioprotetor metanol: Beltsville Thawing Solution (BTS), Andro-Hepes, Zorlesco (ZOR) modificados, meio desenvolvido no Laboratório da UEM (BTZOR), e o meio composto por glicose e gema de ovo e este mesmo, acrescentado o dimetil-sulfóxido (DMSO) como crioprotetor em vez de metanol. Verificou-se que os escores satisfatórios para motilidade progressiva e o vigor espermático, até 72 horas, de 30,00 % e 2,20 pontos respectivamente, para o BTS. O desempenho do BTS foi superior em média 30,00 % para a motilidade progressiva e 27,40 % para o vigor espermático, mesmo em relação ao desempenho do diluidor glicose+gema de ovo+metanol, segundo melhor desempenho. O sêmen de pacu diluído em glicose+gema de ovo+DMSO, Andro-Hepes, ZOR e BTZOR, os espermatozóides após 24 horas apresentaram motilidade progressiva inferior a 20% e com exceção ao diluidor ZOR, o vigor espermático foi inferior a 1,50 pontos.

PALAVRAS-CHAVE

Piaractus mesopotamicus. Resfriamento. Motilidade progressiva. Sêmen. Vigor espermático.

INTRODUÇÃO

Uma das principais aplicações do sêmen criopreservado é a sua utilização a qualquer momento (MONGKONPUNYA; PUIPAT; TIERSCH., 2000). Todavia, a logística mobilizada para aplicação dessa técnica constituiu-se numa desvantagem (HERMAN; MITCHELL; DOAK, 1994). O resfriamento de sêmen é uma alternativa que possibilita utilizar o sêmen dentro de um período de tempo em que possa ser otimizada a sua utilização. A conservação do sêmen refrigerado pode ser perfeitamente aplicada em manejos reprodutivos de peixes, sem os custos do congelamento (RITAR; CAMPET, 2000; STOSS; HOLTZ, 1983;) ou mesmo para conservação do sêmen durante um curto período quando existir dificuldade para realizar congelamento imediato (HE; WOODS III, 2003).

Para viabilizar protocolos de resfriamento de sêmen faz-se necessário o desenvolvimento de soluções diluidoras que mantenham e prolonguem o sêmen viável por algumas horas ou dias. Dentre as características desejadas para uma boa solução diluidora, Park e Chapman (1992) destacam a capacidade de manter os espermatozóides inativos, mas viáveis, durante o período em que esse sêmen seja manipulado. Assim, a composição de soluções diluidoras para sêmen de peixes, de acordo com Suquet et al. (2000), são formuladas utilizando-se basicamente um crioprotetor intracelular, em geral o dimetil-sulfóxido (DMSO) um crioprotetor extracelular, açúcar e algum sal para estabilizar a solução diluidora.

Em estudos mais recentes, têm sido utilizadas proteínas "anti-freeze", além de aminoácidos e a conservação em oxigênio puro (HE; WOODS III 2003). Na avaliação espermática, a premissa inicial para constatar a viabilidade do sêmen reside em observar se os espermatozoides apresentam motilidade e vigor espermático. Desse modo, a motilidade progressiva é um fator preponderante para avaliação da qualidade do sêmen (BILLARD et al., 1995; COSSON et al., 1999; RURANGAWA et al., 2004). Do mesmo modo, o vigor espermático, que se caracteriza pela velocidade com que os espermatozoides se movimentam, é outro parâmetro essencial para caracterizar uma boa avaliação dos espermatozoides de peixes (COSSON et al., 1999). A motilidade espermática, após a diluição e estocagem em temperaturas de resfriamento naturalmente, irá diminuir após algum tempo. Desse modo, as soluções diluidoras a serem utilizadas, necessariamente, devem apresentar composição que imitem a composição iônica seminal e que, portanto, induzam à inativação provisória do espermatozoide, de modo que as reservas energéticas não sejam esgotadas, pois a duração da motilidade depende da energia metabólica (DREANNO et al. 1999).

A preservação do sêmen de espécies brasileiras por curto período de tempo começou a ser difundida recentemente. Em espécies como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (MILIORINI et al., 2002), piapara (*Leporinus obtusidens*) (MURGAS et al., 2002) e curimba (*Prochilodus lineatus*) (FRANCISCATTO et al., 2002) já foram realizados estudos com o BTS (Beltsville Thawing Solution), diluidor para sêmen de suínos, associado ao dimetil-sulfóxido (DMSO), e bons resultados foram obtidos. Por outro lado, Marques e Godinho (2004) apenas mantiveram o sêmen de seis espécies brasileiras resfriado, entre elas *P. mesopotamicus*, e para essa espécie foi registrada, após dezenove horas, uma motilidade pouco maior que 40%.

O objetivo deste experimento foi testar o sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) conservado a 5°C, diluído em meios próprios para sêmen de suínos, Beltsville Thawing Solution (BTS), Andro-Hepes, Zorlesco modificado (ZOR), em meio desenvolvido no Laboratório da UEM (BTZOR) e em meio diluidor preconizado para peixes, glicose+gema de ovo, que foi associado separadamente aos crioprotetores metanol e dimetil-sulfóxido (DMSO).

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá/Cooperativa de Desenvolvimento do Paraná (UEM/CODAPAR) e no Laboratório de Reprodução Animal da UEM.

Sêmen de 12 animais, pesando em média 2.157 ± 583 g e com comprimento total médio de $49,3 \pm 15,8$ cm foram utilizados para o desenvolvimento do experimento. Para obtenção do sêmen, os pacus (*P. mesopotamicus*) foram induzidos com 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peixe, em aplicação única. Para obtenção do sêmen, colhido diretamente no orifício urogenital com uma seringa de 10 ml (BILLARD et al., 1995) foram estabelecidas 240 unidades térmicas acumulada. A determinação do valor de 240 para a UTA ocorreu em função de ser este o valor utilizado no manejo reprodutivo de pacu na região onde foi realizado o experimento. Quando notada a presença de sangue, fezes ou urina, o sêmen foi imediatamente descartado.

O sêmen colhido de cada animal, foi imediatamente diluído, na proporção de 1:3 (sêmen:diluidor), homogeneizado, mantido em frascos plásticos de 40 ml e refrigerado a temperatura de 5°C. A composição dos quatro meios diluidores utilizados para o sêmen de suínos Beltsville Thawing Solution (BTS), Andro-Hepes, Zorlesco modificado (ZOR), diluidor desenvolvido no Laboratório da UEM (BTZOR) e meio diluidor tradicionalmente utilizado para o sêmen de peixe, glicose+gema de ovo, estão relacionados na tabela 1.

Para a avaliação do sêmen foi realizada a verificação da motilidade progressiva e do vigor espermático, e para essas análises utilizou-se um microscópio ótico com objetiva de 40 X. Os procedimentos para análise do sêmen do pacu (*P. mesopotamicus*) estão resumidos a seguir:

- Uma gota (0,02 ml) da solução composta pelo sêmen+diluidor foi diluída em quatro gotas (0,08 ml) de água destilada em uma lâmina. Em seguida, uma gota (0,02 ml) dessa diluição foi colocada sobre uma lâmina de microscopia ótica e coberta por uma laminula e levada ao microscópio pré-ajustado. Colocada a lâmina, foram atribuídos valores de 0 a 100% para a motilidade progressiva e de 0 a 5 pontos para o vigor espermático.

TABELA 1. Composição das soluções diluidoras glicose+gema de ovo, BTS, ZOR, BTZOR e Andro-Hepes acrescidos do agente crioprotetor, utilizados para congelar sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

COMPONENTES	SOLUÇÕES DILUIDORAS					
	Glicose+gema de ovo		BTS ⁷	ZOR ⁸	BTZOR ⁹	Andro-Hepes
Gema de ovo ¹	0,02	0,02				
Glicose (g)	5	5	37	11,5	24	26
Citrato de sódio diidratado (g)			6	11,65	4,8	8,0
Bicarbonato de sódio (g)			1,25	1,75	1,50	1,2
EDTA ² (g)			1,25	2,35	1,80	2,4
TRIS ³ (g)			-	6,50	3,50	
Cloreto de Potássio (g)			0,91	0,16	0,56	
Penicilina G sódica (g)			1,00	1,00	1,00	
Dihidrosteptomina (g)			1,00	1,00	1,00	
Ácido cítrico (g)			-	4,10	2,00	
BSA-V ⁴ (g)			-	5,00	3,00	2,5
Cisteína (g)			-	0,07	0,04	
Hepes (g)						9,0
Água deionizada (L)	0,1	0,1	1,00	1,00	1,00	1,00
Metanol (L)		0,01	0,1	0,1	0,1	0,1
DMSO ⁵ (L)	0,01					

¹ Sem a camada perivitelínica; ² EDTA: Etilenodiamino teracetato; ³ TRIS: Hidroxil-metil-aminometano;

⁴ Soro Fetal Bovino, ⁵ Dimetil-sulfóxido, ⁶ World Fisheries Trust, ⁷ Beltsville Thawing Solution,

⁸ Zorlesco Modificado, ⁹ Meio desenvolvido no Laboratório da UEM.

Após a homogeneização do sêmen de cada um dos doze animais com os diluidores, antes deles seguirem para o refrigerador a 5 °C, realizaram-se as análises de motilidade progressiva e vigor espermático, sendo este considerado o tempo zero.

Após o resfriamento, a cada 24 horas realizou-se o procedimento de análise descrito para motilidade progressiva e o vigor espermático durante um período total de 120 horas. As amostras de sêmen foram retiradas do refrigerador uma a uma, e após a realização das análises foram, em seguida, devolvidas ao refrigerador. O tempo de 120 horas para análise do sêmen foi estabelecido, levando-se em consideração um experimento piloto e o tempo de utilização da estrutura de reprodução para o pacu (*P. mesopotamicus*), uma vez que, desde o momento da captura dos reprodutores, indução e extrusão (24 horas), desenvolvimento embrionário e fase pré-alimentar (96 horas) até o momento da liberação das larvas nos viveiros, são utilizados entre cinco e seis dias. Para a confirmação dos resultados todo este procedimento foi repetido mais duas vezes.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, no qual o sêmen de oito animais foi refrigerado e submetido a seis tratamentos (BTS, BTZOR, ZOR, Andro-Hepe, glicose+gema de ovo com metanol e glicose+gema de ovo associado ao DMSO) e analisados ao longo de seis dias, quanto a sua eficiência para as variáveis, motilidade progressiva e vigor espermático.

As variáveis dependentes (motilidade progressiva e vigor espermático) foram submetidas à análise de regressão, empregando-se o método de quadrados mínimos, de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1T_i + e_{ij}$$

Em que: Y_{ij} = observação do sêmen no tempo (i); b_0 = constante geral; b_1 = coeficiente de regressão linear da observação (y) em função do tempo (i); T_i = tempo (i) de exposição do sêmen; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ij} .

Os coeficientes de regressão foram comparados por meio de contrastes com base numa análise de covariância com efeito de tratamento e covariável linear de tempo aninhado em tratamento. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade progressiva e o vigor espermático médio do sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) diluído nas seis soluções (diluidores + crioprotetor) apresentaram um comportamento linear negativo ao longo do tempo (Figuras 1 e 2).

O sêmen diluído no meio BTS, apresentou o melhor rendimento, em relação aos outros diluidores, para a motilidade progressiva desde o tempo zero até próximo de 96 horas (tempo 4) refrigerado a 5 °C, sendo então superada, pelo diluidor glicose+gema de ovo+metanol. Todavia, no período entre 96 e 120 horas (tempo 4 e 5) a motilidade progressiva inferior a 15% (Figura 1).

O sêmen do pacu (*P. mesopotamicus*) quando diluído no meio ZOR, no tempo zero, apresentou motilidade progressiva média de 65%, porém, após

24 horas (tempo 1) caiu para 15% chegando a menos 5% após 48 horas (tempo 2) (Figura 1). Para o sêmen diluído no meio BTZOR, que no tempo zero, apresentava motilidade progressiva média de 33%, após 24 horas (tempo 1) era menor que 5%, chegando próximo de 0% em 48 horas (tempo 2) de resfriamento em temperatura de 5 °C (Figura 1).

A motilidade progressiva média do sêmen diluído nos meios Andro-Hepe e gema de ovo+glicose+DMSO apresentaram desempenho semelhante, com motilidade progressiva média inferior a 20%, chegando próximo a 0% em 48 horas (tempo 2) de refrigeração a 5 °C. (Figura 1).

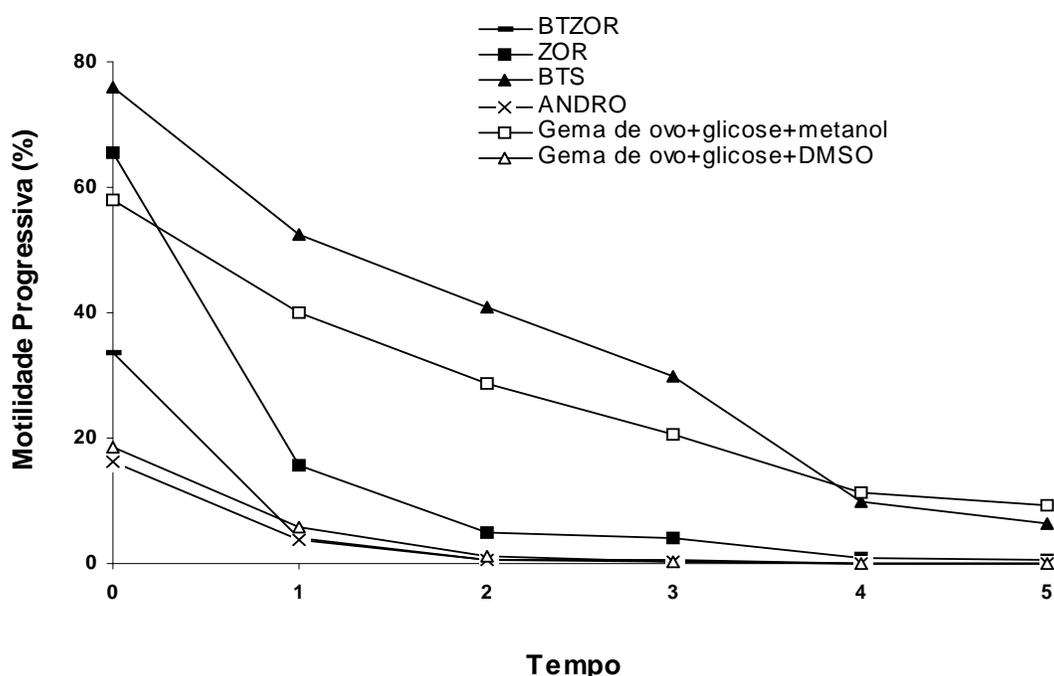


Figura 1. Motilidade progressiva média (%) do sêmen resfriado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) diluído nos meios BTZOR, ZOR, BTS, Andro-Hepe, gema de ovo+glicose+metanol e gema de ovo+glicose+DMSO ao longo do tempo 0; 1 (24 horas); 2 (48 horas); 3 (72 horas); 4 (96 horas) e 5 (120 horas). Equações de regressão e R^2 respectivamente; BTZOR: $y = 24,53 - 5,16x$ ($R^2 0,52$); ZOR: $y = 52,16 - 10,55x$ ($R^2 0,61$); BTS: $y = 84,56 - 13,91x$ ($R^2 0,97$); Andro: $y = 12,70 - 2,64x$ ($R^2 0,60$); gema de ovo+glicose+metanol: $y = 61,49 - 9,61x$ ($R^2 0,94$); gema de ovo+glicose+DMSO: $y = 15,68 - 3,21x$ ($R^2 0,66$).

O vigor espermático médio do sêmen diluído no meio BTS apresentou 3,3 pontos no tempo zero. Durante o período de 24 horas (tempo 1) e 72 horas (tempo 3) permanecendo entre 2,5 e 2,2 pontos respectivamente na casa de 2,2 pontos, e após 120 horas (tempo 5) foi inferior a 1 ponto (Figura 2). Quando o meio utilizado foi glicose+gema de ovo+metanol, o vigor espermático apresentava 3 pontos em média, no tempo zero. Entre o 24 e 72 horas (tempo 1 e 3, respectivamente) variou apenas 0,3 pontos, indo de 2,0 à 1,7 pontos respectivamente. No período final de tempo, entre 96 e 120 horas ficou em 1 ponto (Figura 2).

O sêmen diluído no meio ZOR apresentou vigor espermático que variou de 2,5 pontos para o tempo

zero e 1,9 ponto após 24 horas (tempo 1). Porém, quando o sêmen foi analisado durante e após 48 horas (tempo 2), o vigor espermático médio ficou abaixo de 1 ponto (Figura 2).

Os diluidores BTZOR, Andro-Heppe e glicose+gema de ovo+DMSO mostraram desempenho semelhante quanto ao vigor espermático médio do sêmen refrigerado a 5°C. No tempo zero, o sêmen quando diluído em BTZOR (2,2 pontos) foi um pouco superior ao Andro Heppe (1,9 pontos) e ao glicose+gema de ovo+DMSO (1,8 pontos). Porém, quando se analisou o sêmen diluídos nesses meios em 48 horas (tempo 2), o vigor espermático já estava abaixo de 1 ponto percentual (0,3; 0,3 e 0,6 respectivamente) (Figura 2).

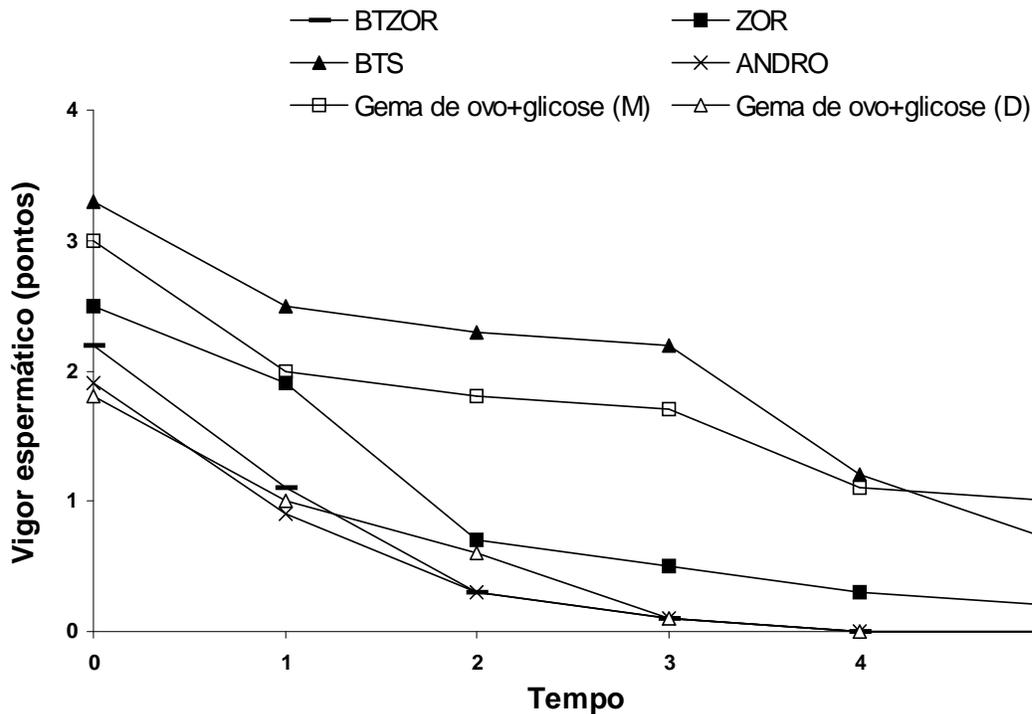


Figura 2. Vigor espermático médio do sêmen resfriado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) diluído nos meios BTZOR, ZOR, BTS, Andro-Heppe, gema de ovo+glicose (M) (Metanol) e gema de ovo+glicose (D) (DMSO) ao longo do tempo 0; 1 (24 horas); 2 (48 horas); 3 (72 horas); 4 (96 horas) e 5 (120 horas). Equações de regressão e R^2 ; BTZOR: $y = 2,04 - 0,41x$ ($R^2 0,78$); ZOR: $y = 2,38 - 0,42x$ ($R^2 0,86$); BTS: $y = 3,70 - 0,48x$ ($R^2 0,94$); Andro: $y = 1,77 - 0,35x$ ($R^2 0,78$); gema de ovo+glicose (M): $y = 3,05 - 0,37x$ ($R^2 0,90$); gema de ovo+glicose (D): $y = 1,87 - 0,36x$ ($R^2 0,87$).

A declividade da reta para a motilidade progressiva encontrada quando o sêmen foi diluído em BTS, apresentou a maior ($P < 0,05$) declividade com relação a todos os outros tratamentos. Quando a motilidade progressiva foi verificada nos tratamentos BTZOR, Andro-Heppe e gema de ovo+glicose+DMSO, os coeficientes de declividade das retas foram similares ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Todavia foram menores ($P < 0,05$) que os obtidos nos tratamentos ZOR e gema de ovo+glicose+metanol, que não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$). Quanto ao vigor espermático, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2).

Quanto à intersecção da reta com o eixo Y, a motilidade progressiva do sêmen diluído em BTS, apresentou um percentual mais elevado ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Os percentuais da motilidade progressiva também diferiram entre os

demais tratamentos, pois, a motilidade progressiva obtida do sêmen diluído em gema de ovo+glicose+metanol, foi superior ($P < 0,05$) à observada quando se utilizou ZOR, que por sua vez foi superior ($P < 0,05$) ao BTZOR, Andro-Heppe e a gema de ovo+glicose+DMSO onde não houve diferença ($P > 0,05$) entre os três (Tabela 2).

Para o vigor espermático, também foi observado um valor mais elevado ($P < 0,05$) do vigor espermático no ponto de intersecção da reta com o eixo Y no sêmen diluído em BTS do que nos demais tratamentos. Quanto aos demais tratamentos o sêmen diluído em gema de ovo+glicose+Metanol foi superior ($P < 0,05$) aos ZOR, que por sua vez foi superior ($P < 0,05$) ao Andro-Heppe e a gema de ovo+glicose+DMSO. Porém, não houve diferença ($P > 0,05$) no valor do vigor espermático no ponto de intersecção da reta com o eixo Y, quando o sêmen foi diluído em ZOR e BTZOR, assim como entre BTZOR e Andro Heppe e gema de ovo+glicose+DMSO (Tabela 2)

TABELA 2. Coeficiente de declividade das retas da motilidade progressiva e do vigor espermática do sêmen de *P. mesopotamicus*, quando os espermatozóides estiveram submetidos aos tratamentos com BTZOR, ZOR, BTS, Andro-Heppe, gema de ovo+glicose+metanol e gema de ovo+glicose+DMSO.

TRATAMENTOS	COEFICIENTES DE DECLIVIDADE DA RETA		INTERSECÇÃO DA RETA COM O EIXO "Y"	
	Motilidade progressiva	V i g o r espermático	Motilidade progressiva	V i g o r espermático
BTZOR	-5,16c	-0,41	24,53d	2,04cd
ZOR	-10,55b	-0,42	52,17c	2,38c
BTS	-13,91a	-0,48	84,56a	3,70a
Andro-Heppe	-2,64c	-0,35	12,70d	1,78d
Gema de ovo+glicose+metanol	-9,61b	-0,37	61,49b	3,05b
Gema de ovo+glicose+DMSO	-3,21c	-0,36	15,69d	1,87cd

Letras diferentes na mesma coluna $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

Os índices espermáticos obtidos ao se utilizar o meio diluidor BTS com o crioprotetor metanol para o sêmen de *P. mesopotamicus*, foram promissores, pois para os parâmetros analisados até 72 horas, registrou-se 30% para a motilidade progressiva e 2,2 pontos para o vigor espermático. O mesmo BTS, porém com 10% de DMSO, para a mesma espécie, foi testada por Miliorini et al. (2002) que ao reativarem os espermatozoides após 24, 48 e 72 horas, apresentaram motilidade espermática de 62,5; 37,5 e 22,5% respectivamente. Quando comparados com os resultados encontrados por Miliorini et al. (2002), observa-se que no presente estudo o BTS utilizado como crioprotetor metanol apresentou valores de motilidade progressiva mais elevados em 48 e 72 horas, 40,8 e 30,0% respectivamente. Não são conhecidos parâmetros mínimos aceitáveis para motilidade progressiva e vigor espermático de espécies de peixes nativas brasileiras, todavia uma motilidade abaixo de 30% necessariamente não é uma prerrogativa para falta de capacidade fertilizante dos espermatozoides. Usando sêmen de "sharpooth catfish" após descongelamento, com motilidade progressiva entre 20 e 30%, Urbányi, Dinnyés e Magyary (2000) não observaram diferença na taxa de fertilização em relação ao sêmen com motilidade entre 90 e 100% usado "a fresco".

A boa eficiência do BTS na preservação da viabilidade do sêmen de pacu refrigerado, também pode ser constatada quando confrontado com os outros diluentes testados neste trabalho, especialmente com relação aos outros diluidores para sêmen de suíno, BTZOR, ZOR e Andro-Hepes. Embora o BTS tenha apresentado perdas na motilidade progressiva e no vigor espermático, ainda assim foi 39,5% e 27,4 % em média superior a glicose+gema de ovo+metanol, que apresentou o segundo melhor desempenho, respectivamente até 72 horas. Embora a declividade das retas para ambas variáveis do sêmen diluído em BTS, motilidade progressiva (-13,91) e vigor espermático (-0,48), tenha sido mais elevada do que as dos demais tratamentos, esse fato é compensado pelas maiores médias obtidas quando da intersecção da reta com o eixo "Y", 84,56% e 3,7 pontos, para a motilidade progressiva e o vigor espermático, respectivamente.

A diferença de desempenho dos demais diluidores de suínos testados em relação ao BTS pode ser atribuída à composição diferente dos meios.

Os meios diluidores de suínos em geral são baseados em tampões orgânicos ziterionicos (WELTZE, 1990) como o Tris e Hepes, responsáveis por capturar metais pesados e pelo controle do pH no sêmen de suínos (JONHSON et al., 2000), porém os tampões Tris e Hepes não estão presentes no BTS. Além disto, Pickett (1993) definiu que um meio diluidor deve possuir dentre outras qualidades, pressão osmótica compatível com os espermatozoides, equilíbrio adequado de elementos minerais e uma combinação apropriada de nutrientes. Então o BTS além de não possuir em sua composição os tampões orgânicos citados, muito provavelmente apresentou as qualidades citadas por Pickett (1993), o que pode ter determinado o bom desempenho deste diluidor.

Mesmo tendo apresentado um desempenho inferior ao BTS, o tradicional diluidor para peixes glicose+gema de ovo, mostrou um desempenho melhor na refrigeração do sêmen de pacu a 5 °C, quando associado ao crioprotetor metanol, em relação ao DMSO, fato que chamou a atenção, pois o DMSO é o crioprotetor recomendado por Carolsfeld et al. (2003) na criopreservação do sêmen de *P. mesopotamicus*, além de outras espécies migradoras brasileiras. O uso do metanol associado ao diluidor de Hanks (HBSS) para o sêmen de channel catfish (*Ictalurus punctatus*), resultou em uma motilidade espermática de 25% após 14 dias de refrigeração (TIERSCH et al., 1994). Já o DMSO associado ao BTS na preservação do sêmen refrigerado de piapara (*Leporinus obtusidens*), propiciou motilidade espermática de 35% após 96 horas a 4 °C no estudo de Murgas et al. (2002).

CONCLUSÃO

O meio diluidor para suínos Beltsville Thawing Solution (BTS) associado ao crioprotetor metanol, pode ser utilizado para a refrigeração a 5 °C, do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por até 72 horas, mantendo os espermatozoides com motilidade progressiva média de 30% e vigor espermático de 2,2 pontos.

No sêmen diluído em BTS, a queda na motilidade progressiva (-13,91%) e no vigor espermático (-0,48 pontos) ao longo do tempo, foi a mais elevada entre todos os tratamentos testados, compensado pelas maiores médias iniciais, 84,56% (motilidade progressiva) e 3,7 pontos (vigor espermático).

ABSTRACT

The semen quality from twelve sexually mature pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a tropical freshwater fish, were investigated after thermal preservation under the freezing condition of 5°C during 120 hours, in addition to a previous dilution into five artificial extenders containing methanol. Modified extenders for spermatozoa preservation were the Beltsville Thawing Solution (BTS), Andro-Hepes, Zorlesco (ZOR), special extender developed in the facilities of the Reproduction Laboratory at Maringá State University (BTZOR), and extender containing glucose and egg yolk, and like glucose, egg yolk, and dimethyl-sulphoxide (DMSO) another crioprotector. Seventy two hours later, the sperm cells had a progressive motility of 30.00% and a spermatoc vigor of score 2.20 for the conditions found into the BTS extender. The spermatozoa from the BTS extender performed a progressive motility 30.0% higher than the average, and 27.4% for the spermatoc vigor in comparison to the glucose + egg yolk + metanol extender, the first one in the descendant order. However, twenty four hours under freezing preservation, the progressive motility was reduced to less than 20% for the glucose + egg yolk + DMSO, Andro-Hepes, and ZOR extenders, and from the BTZOR the spermatozoa performed a vigor less than score 1.5.

KEY-WORDS

Fish. Criopreservation. Freshwater fish. Progressive motility. Spermatozoa vigor.

REFERÊNCIAS

- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. (Ed.). Broodstock management and egg larval quality. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.25-52.
- ROBERTS, R.J. Broodstock management and egg larval quality. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.1-24.
- CAROSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. Journal of Fish Biology, London, v.63, n.2, p.472-489, Aug 2003.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: C. GAGNON (Ed.). In the male gamete: From basic knowledge to clinical applications. Paris: Cache River Pres, 1999. p.161-186.
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYÈRES, E.; COSSON, J.; LE DELLIOU, H.; BILLARD, R. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, Amsterdam, v.169, n.2, p.247-262, Nov. 1998.
- FRANCISCATTO, R.T. MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.213-215, Jul.-Set. 1999.
- HE, S.; WOODS III, L.C. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. Cryobiology, San Diego, v.46, n.1, p.17-25, Feb. 2003.
- HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. Semen evaluation; extender (processing); frozen semen; custom collection. In: . The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. 8.ed. Illinois: Interstate Publishers, 1994. p.59-142.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISHER, P.; MAXWELL, W. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, Amsterdam, v.62, n.1, p.143-172, Aug. 2000.
- MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v.47, n.5, p.799-804, Aug. 2004.
- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M.; FRANCISCATTO, R.T.; SILVA, M.O.B.; MARIA, A.N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.209-211, Jul.-Set. 2002.
- MONGKONPUNYA, K.; PUIPAT, T.; TIERSCH, T.R. Cryopreservation methods for sperm of the Mekong giant catfish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, T.P. (Eds.). Cryopreservation in Aquatic Species. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, p.290-291.

- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; SILVA, M.O.B.; FRANCISCATTO, R.T.; MARIA, A.N. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4 °C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.26, n.3, p. 211-213, 2002.
- PARK, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperms membranes. *Theriogenology*, Stoneham, v.38, n.2, p.209-222, Aug. 1992.
- PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.). *Equine reproduction*. Filadelfia: Lea & Febiger, 1993. p.746-754.
- RITAR, A.J.; CAMPET, M. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineata*). *Theriogenology*, Stoneham, v.54, n.3, p.467-480, Aug. 2000.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I., HUYSKENS, G.; EMBRAHIMI, M.; KIME, D.E.; OLIVIER, F. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal Fish Biology*, London, v.53, n.2, p.402-413, Aug. 1998.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements. Cary, 1992. (SAS technical report P-229, release 6.07).
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, Oxford, v.31, n.3, p.231-243, Mar. 2000.
- STOSS, J.; HOLTZ, W. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, Amsterdam, v.31, n.3-4, p.269-274, May. 1983.
- TIERSCH, T.R.; GOUDIE, C.A.; CARMICHEL, G.J. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*, Bethesda, v.123, n.6, p.580-586, Nov. 1994.
- URBÁNYI, B.; DINNYÉS, A.; MAGYARY, I. Cryopreservation methods for sperm of the sharptooth catfish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.286-287.
- WELTZE, K.F. The use of long-term extender in pig AI a view of the international situation. *Pig News Information*, Farnham Royal, v.11, n.1, p.23-26, Mar. 1990.

Danilo P. Streit Jr.
Avenida Bento Gonçalves - 7712
Porto Alegre - RG
CEP - 91540-000
e-mail: danilo.streit@ufrg.br

TRAMITAÇÃO

Artigo recebido em: 14/05/2006

Aceito para publicação em: 14/02/2008