

SÊMEN DE PACU *Piaractus mesopotamicus* CONGELADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GELÉIA REAL

Juliana Minardi Galo*, Melanie Digmayer, Danilo Pedro Streit Júnior, Ricardo Pereira Ribeiro, Gentil Vanini de Moraes, Rodolfo Nardez Sirol, Lauro Daniel Mendez Vargas e Thiago Peres Gualda

*Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Zootecnia. CEP: 87030-121 Bairro Zona 07.
E-mail: juliminardi@hotmail.com

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros seminais do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), criopreservado com diferentes concentrações de geléia real. Para a realização do trabalho selecionou-se oito animais. Foram analisados os parâmetros: motilidade progressiva, vigor espermático, concentração espermática e morfologia espermática. Nos resultados obtidos, verificou-se que não houve influência da geléia real nos resultados da congelação, se comparado com os resultados do diluidor testemunha (Branco). A diluição 3 obteve um melhor resultado para a motilidade progressiva, porém, não houve diferença significativa entre os meios. Para o vigor espermático, as diluições que continham geléia real sobressaiu-se a 4 ($1,88 \pm 1,25$ pontos) e apresentaram os maiores valores comparados com o testemunha (branco), mas estatisticamente não houve diferença. Embora não tenha ocorrido diferença significativa para o percentual de espermatozóides normais e anormalidades espermáticas, houve uma média superior de anormalidades primárias. O meio diluidor contendo geléia real não promoveu resultados satisfatórios, sendo necessários novos estudos para verificar se a geléia real pode aperfeiçoar o meio diluidor durante o processo da criopreservação. Além disto, foi possível notar a existência de individualidade em relação a resistência do sêmen a congelação.

Introdução

O processo de preservação dos espermatozóides engloba, além do interesse científico, o poder de subsidiar a aquacultura comercial através de reprodutores selecionados, plantéis em melhores condições genéticas e a não dependência da sincronia entre a maturação de machos e fêmeas (Kavamoto, 1989).

Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por inúmeras qualidades, como, o excelente sabor da sua carne, boa capacidade para ganho de peso, adaptabilidade e rusticidade no cultivo e hábito onívoro (Castagnolli, 1992).

Destacando os fatores favoráveis do pacu na piscicultura, levou-se o estudo da criopreservação contendo diluidores com substâncias nutritivas consideráveis, a fim de aumentar a viabilização da técnica. A geléia real no meio diluidor é uma das possibilidades que poderá elevar o valor nutritivo do meio. Além disto, a geléia real é um produto natural que contém notáveis quantidades de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, substâncias minerais, fatores vitais específicos, substâncias biocatalisadoras nos processos de regeneração das células, além de conter flavonóides que são elementos antioxidantes desenvolvendo importante ação fisiológica (Cicco, 2005).

O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros seminais do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), criopreservado com diferentes concentrações de geléia real.

Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido na Estação de Hidrologia e Aqüicultura da DUKE ENERGY INTERNATIONAL - *Geração Paranapanema*, em convênio com o Laboratório de Reprodução Animal da UEM. Os animais foram selecionados no tanque de reprodutores e levados para o laboratório da Estação onde foram induzidos para a colheita do sêmen, os quais foram pesados e medidos. Para a realização do projeto, foram selecionados oito animais. Os peixes foram induzidos a espermição, utilizando-se hipófise de carpa, sendo ministrado uma dose única de 3 mg de hipófise/kg de peso vivo.

Em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída uma gota (0,02 ml) de sêmen com oito gotas (0,16 ml) de água destilada e levado ao microscópio de contraste de fase com objetiva de 40X e avaliado, por método subjetivo, ambas variáveis. A motilidade progressiva foi avaliada utilizando o escore de 0 a 100 % e o vigor espermático escore de 0 a 5 pontos, sendo que os valores mais elevados significam melhor qualidade.

Foram feitos dois esfregaços com o sêmen diluído em formol-salina tamponada, na proporção de 1:250 (sêmen/solução diluente). Os esfregaços foram corados pelo método Rosa de Bengala e depois secos, levados ao microscópio de contraste em objetiva de 40X. Foram avaliadas anormalidades primárias e secundárias. Realizou-se contagem de 100 a 150 espermatozóides entre as lâminas feitas de cada animal.

Os peixes foram embrulhados em uma toalha úmida e, foi aplicada uma massagem abdominal no animal no sentido encéfalo-caudal. O sêmen liberado foi, então, colhido em seringas de 10 mL (Billard et al., 1995). Foram analisados os parâmetros seminais como: motilidade progressiva, vigor espermático e concentração de espermatozóides.

O sêmen foi diluído em um Becker contendo formol-salina tamponada, resultando na diluição de 1:250. Feita a diluição, foi preenchido, por capilaridade, a câmara de Neubauer e contados os espermatozóides.

O meio diluidor do sêmen para congelar foi indicado por Carolsfeld et al. (2003), sendo adicionado geléia real nas concentrações indicadas na tabela 1. Foram preparados nove meios diluidores, contendo diferentes concentrações de geléia real e um meio contendo somente DMSO, glicose+gema de ovo, considerado o branco. O meio diluidor continha 10 mL de DMSO, 5g de glicose, 20g de gema de ovo e a concentração de geléia real correspondente a cada tratamento, sendo estes completados com água destilada até 100 mL. A geléia real do tipo gel, foi acrescentada na hora da preparação do meio.

O sêmen foi misturado à solução crioprotetora na proporção de 1:3 (sêmen/solução crioprotetora) e após foi submetido ao congelamento. Homogeneizado o sêmen com a solução crioprotetora, a mistura foi envasada em “pailletts” de 0,25 mL, esterilizados e identificados. Os “pailletts” contendo o sêmen diluído foram colocados em “globelets” plásticos que foram fixados nas hastes de alumínio e, posteriormente, foram colocados na “caneca” e submetidos ao vapor de nitrogênio à -16°C em um botijão do tipo “Dry shipper”. Antes de iniciar o procedimento de congelamento. Os “pailletts” permaneceram por 18 horas no “Dry shipper”, e depois foram transferidos para um botijão de estoque à -196°C.

Tabela 1. Meio diluidor destinado a congelar o sêmen de Pacu (*P. mesopotamicus*) composto por gema de ovo+glicose+DMSO (por 100 mL), acrescido de diferentes concentrações de geléia-real.

Geléia Real (g)	Dimetilsulfóxido (DMSO) (mL)	Glicose + ovo (completados para 100 mL)
D ₁ - 0,002	10 mL	5 g + 20 g
D ₂ - 0,004	10 mL	5 g + 20 g
D ₃ - 0,006	10 mL	5 g + 20 g
D ₄ - 0,008	10 mL	5 g + 20 g
D ₅ - 0,010	10 mL	5 g + 20 g
D ₆ - 0,012	10 mL	5 g + 20 g
D ₇ - 0,014	10 mL	5 g + 20 g
D ₈ - 0,016	10 mL	5 g + 20 g
D ₉ - 0,018	10 mL	5 g + 20 g
D ₁₀ - 0,000 (branco)	10 mL	5 g + 20 g

D - diluidor

Os “paillets” contendo sêmen foram retirados do botijão de N₂ e colocados em água 45° C, em banho-maria, durante 5 segundos. Após a descongelação foram feitas as análises qualitativas do sêmen, como motilidade progressiva, vigor espermático e morfologia espermática.

Os dados foram analisados utilizando o programa SAEG, de acordo o delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se a transformação radicial e, as médias, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Na tabela 2, estão apresentados os dados de motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) “in natura”. Na tabela 3, estão apresentados os dados de motilidade progressiva, vigor espermático e concentração espermática do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) descongelado e avaliado, considerando as diferentes concentrações de geléia real.

Tabela 2. Parâmetros qualitativos do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pré-congelação (in natura).

Peixes	Parâmetros		
	Motilidade progressiva (%)	Vigor espermático (pontos)	Concentração espermática x10 ⁵ /mL
1	70,0	2,0	4,97
2	80,0	2,0	4,18
3	60,0	2,0	11,72
4	90,0	2,0	7,08
5	70,0	2,0	10,31
6	70,0	2,0	6,85
7	70,0	3,0	6,88
8	60,0	3,0	6,12

Tabela 3. Parâmetros Qualitativos do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) descongelado a 45° C por 5 minutos, nas diferentes concentrações de geléia real.

Diluição	Parâmetros	
	Motilidade progressiva (%)	Vigor espermático (pontos)
D1	8,00 ± 17,09	1,63 ± 0,91
D2	1,00 ± 1,69	1,13 ± 1,25
D3	11,71 ± 15,50	1,14 ± 0,90
D4	9,50 ± 12,84	1,88 ± 1,25
D5	5,86 ± 6,59	1,43 ± 0,79
D6	1,86 ± 3,62	0,85 ± 0,90
D7	4,75 ± 7,05	1,38 ± 1,19
D8	4,00 ± 7,26	1,29 ± 1,11
D9	3,38 ± 3,50	1,38 ± 0,92
D10	6,57 ± 14,85	0,71 ± 1,11

Pode-se notar que a geléia real não influenciou nos resultados da congelação, se comparado com os resultados do diluidor testemunha (Branco). A diluição 3 obteve um melhor resultado para a motilidade progressiva, porém, não houve diferença significativa entre os meios. Para o vigor espermático as diluições que continham geléia real, sobressaindo-se a 4 ($1,88 \pm 1,25$ pontos), apresentaram os maiores valores comparados com o testemunha (branco), mas estatisticamente não houve diferença (Tabela 3).

Supõe-se que a quantidade de geléia real utilizada, não beneficiou a qualidade do meio diluidor para manutenção dos espermatozóides durante a criopreservação. A composição do meio diluidor é de fundamental importância a fim de garantir a conservação das células espermáticas de peixes durante a criopreservação (Tan-Fermin et al. 1999). Carolsfeld et al. (2003) sugeriram a utilização do meio diluidor a base de glicose e gema de ovo, associado a 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO), que de acordo com He e Woods III (2003) tem peso molecular pequeno e, por isso, apresenta elevada permeabilidade celular.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa para o percentual de espermatozóides normais e anormalidades espermáticas, houve uma média superior de anormalidades primárias (Tabela 4). Herman et al. (1994) relatam que as anormalidades primárias em mamíferos, estão relacionadas a fatores que incidem sobre a espermatogênese (deficiência nutricional, idade dos machos, consangüinidade, além de doenças que possam acometer os reprodutores) e as anormalidades secundárias, estão relacionadas a fatores ligados a temperatura ambiente, doenças, alimentação do animal, problemas no ducto espermático, extrusão do sêmen, além da confecção dos esfregaços.

Pela Tabela 5, pode se fazer a inferência da individualidade, pois no peixe 1, observa-se melhor resultado, seguido pelo 8 e 7, e os demais foram inferiores e se assemelharam. Esses são resultados importantes, pois indicam que nem todos os reprodutores fornecem sêmen com características para suportar a congelação. Além do mais, o melhor valor foi de 22,5% de motilidade progressiva, que pode ser contrastado com os resultados de Billard et al. (2004) que obtiveram 94% de fecundidade com o sêmen que apresentou menos de 10% de motilidade progressiva após a descongelação.

Tabela 4. Médias e desvios padrão de espermatozóides normais, anormalidades primárias e secundárias avaliados no sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), descongelado a 45° C por 5 minutos, nas diferentes diluições.

Diluição	Parâmetros		
	Espermatozóides normais (%)	Anormalidades primárias (%)	Anormalidades secundárias (%)
1	25,53 ± 7,37	56,18 ± 6,48	18,29 ± 7,34
2	25,10 ± 9,91	58,17 ± 6,19	16,74 ± 7,36
3	24,14 ± 10,08	56,76 ± 5,80	19,65 ± 5,96
4	26,32 ± 9,91	53,53 ± 5,35	20,15 ± 7,07
5	28,76 ± 8,06	54,55 ± 4,57	16,68 ± 6,41
6	26,60 ± 8,56	53,54 ± 5,16	19,86 ± 5,64
7	31,98 ± 8,30	53,39 ± 6,00	14,74 ± 4,66
8	30,81 ± 10,06	53,27 ± 9,73	14,49 ± 2,33
9	28,53 ± 8,89	52,37 ± 6,74	19,10 ± 4,35
10	26,76 ± 10,49	56,41 ± 6,89	16,83 ± 7,83

O objetivo do trabalho foi verificar o benefício da geléia real no meio diluidor, mas os resultados não foram satisfatórios. Porém, notou-se a diferença entre os indivíduos em relação aos parâmetros qualitativos do sêmen. Neste sentido, Mocé et al. (2005), afirmaram que o sêmen de machos de diferentes espécies, tem sido classificado como bom ou ruim para a congelamento, conforme sua resistência ao congelamento e descongelamento.

As membranas seminais sofrem muito estresse durante a criopreservação, incluindo o estresse aniosmótico durante a adição dos crioprotetores, bem como formação de cristais de gelo e exposição ao aumento da concentração salina (Holt, 2000). É possível que certos machos produzem sêmen contendo diferentes lipídios, proteínas, entre outros, que favorecem uma maior resistência ao estresse, resultando em um aumento da crio-sobrevivência, e, talvez, promovendo melhor fertilização que o sêmen de machos que não são resistentes a esse estresse (Mocé et al., 2005).

Tabela 5. Médias da motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após descongelamento, nos diferentes peixes.

Peixes	Parâmetros	
	Motilidade progressiva (%)	Vigor espermático (pontos)
1	22,5	2,1
2	1,3	0,9
3	2,1	0,9
4	1,0	0,8
5	1,0	1,2
6	1,9	1,0
7	4,8	1,4
8	8,1	1,8

Conclusão

O meio diluidor contendo geléia real não promoveu resultados satisfatórios, sendo necessários novos estudos para verificar se a geléia real pode aperfeiçoar o meio diluidor durante o processo da criopreservação. Além disto, foi possível notar a existência de individualidade em relação a resistência do sêmen a congelação

Referências

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. et al. Broodstock management and seed quality- General considerations. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R.J. (Eds). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, p.01-24, 1995.

BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, S.B. et al. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v.236, p.1-9, 2004.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E. et al. Cryopreservation of sperm in brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489, 2003.

CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 71-96.

CICCO, L. H. S. de. **Produto das Abelhas**. 10/11/2005

DUKE ENERGY INTERNATIONAL - Geração Paranapanema S.A. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Horizontes Geográfico, 2003.

HE, S.; WOODS III, L.C. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. **Cryobiology**, v.46, n.1, p.17-25, 2003.

HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Illinois: Interstate Publishers, 1994.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.

KAVAMOTO, E.T.; SILVEIRA, W.F. da; et al. **Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com Sêmen Criopreservado em Nitrogênio Líquido**. Boletim do Instituto de Pesca, v.16, u.1, p.29-36, 1989.

MOCÉ, E; LAVARA, R; VICENTE, J.S. Influence of the Donor Male on the Fertility of Frozen-Thawed Rabbit Sperm after Artificial Insemination of Females of Different Genotypes. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p.516-521, 2005.

TAN-FERMIN, J.D.; MIURA, T.; ADACHI, S.; et al. Seminal plasma composition, sperm motility, milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther). **Aquaculture**, v.171, n. 3-4, p.323-338, 1999.