

## EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NO DESCONGELAMENTO DE SÊMEN SUÍNO

Bianchi I.<sup>1</sup>; Corrêa, M.N.<sup>1</sup>; \*Lucia Jr., T.<sup>1</sup>; Corrêa, E.K.<sup>1</sup>; Piassi, L.M.<sup>1</sup>; Calderam, K.<sup>1</sup>; Ulguim, R.R.<sup>1</sup>; Madeira, E.M.<sup>1</sup>; Deschamps, J.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos, Centro de Biotecnologia, Campus Universitário s/n°, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 [ibianchi@ufpel.edu.br](mailto:ibianchi@ufpel.edu.br) (53) 84051356

### INTRODUÇÃO

O sêmen suíno resfriado entre 15-18°C é utilizado na maioria das inseminações artificiais (IA). Os índices de fertilidade com IA são similares aos obtidos com monta natural, quando o sêmen resfriado é utilizado até 72 h após o início do armazenamento, mas aproximadamente 85% das IA são realizadas no dia da coleta do sêmen ou no dia seguinte (9). O diluente mais utilizado para sêmen suíno resfriado é o *Beltsville Thawing Solution* (BTS), desenvolvido inicialmente para sêmen congelado, sendo, posteriormente, adaptado para o acondicionamento de sêmen à 15-18°C (15). Alguns diluentes foram desenvolvidos para permitir maior tempo de estocagem entre 5-7 d (10), ou para armazenamento do sêmen a 5°C (6). O congelamento do sêmen é uma biotécnica reprodutiva importante para aumentar a eficiência de produção dos rebanhos, especialmente devido à possibilidade do uso em maior escala de animais geneticamente superiores (8). Porém, durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento os espermatozoides são expostos a várias situações adversas a sua homeostase, tornando-o susceptível aos choques térmico e osmótico que podem promover alterações estruturais e funcionais na célula espermática, com prejuízos para a motilidade e nas trocas que ocorrem através da membrana plasmática (4, 5). Nos protocolos de congelamento, a gema de ovo é usualmente adicionada aos diluidores, a fim de proteger a membrana da célula espermática das injúrias provocadas por baixas temperaturas, especialmente abaixo de 15°C. O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (3, 17). A ação crioprotetora da LDL purificada da gema de ovo sobre a preservação de sêmen suíno foi estudada com o uso de sêmen resfriado (7). O diluente PIGPEL-5 (6), desenvolvido para o acondicionamento de sêmen suíno a 5°C, possui gema de ovo na sua composição, possibilitando seu uso em protocolos para o congelamento do sêmen suíno. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes crioprotetores durante o tempo de resfriamento pré-congelamento e seu efeito na motilidade no descongelamento do sêmen suíno.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois machos (A e B) suínos cruzados (Landrace x Large White), com, aproximadamente, 18 meses de idade, que apresentavam fertilidade conhecida e que eram mantidos em baias individuais, sob as mesmas condições ambientais, na Estação Experimental da Palma, Universidade Federal de Pelotas (Brasil). Os machos eram alimentados com ração balanceada, com formulação baseada nos níveis nutricionais indicados (13), ajustada à sua condição corporal. Foram coletados dez ejaculados de cada macho, semanalmente. As coletas através do método da mão-enluvada (1), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel. Imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota de 10 mL da fração rica em espermatozoides foi diluída (1:1, v/v), em tubo cônico de 50 mL, em cada um de três diluentes: BTS (15), PIGPEL-5 (6) e PIGPEL-5, com substituição de gema de ovo por LDL (PIGPEL+). A LDL foi obtida através do protocolo utilizado para sua purificação da gema do ovo (12). Na curva de resfriamento, após a diluição inicial em cada um dos três diluidores de resfriamento, os frascos permaneciam 90 m a 20°C e, após, 180 m a 15°C. Após atingirem 15°C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 m), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de espermatozoides obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo; pH de 6,1) com uma concentração de  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL (18). Após, 2 mL da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL, realizando-se o resfriamento por 90 m à 5°C. Aos 5°C, os tubos cônicos com 2 mL de espermatozoides diluídos foram re-suspenso em 1 mL do diluidor de congelamento (89,5% de diluidor de resfriamento + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 9% glicerol, v/v; pH de 6,83) para uma concentração final de  $1,0 \times 10^9$  espermatozoides/mL e 3% de glicerol. Após a adição do diluidor de congelamento o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de  $500 \times 10^6$  espermatozoides/palhetas. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 m, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C. O descongelamento das palhetas foi realizado a 50°C por 40 s em banho-maria com circulação de água. As palhetas foram re-suspenso (1:10, v/v) em tubos cônicos de 15 mL (14), nos diluentes BTS, PIGPEL-5 e PIGPEL+ e incubados a 37°C. A avaliação da motilidade espermática foi realizada através de microscopia ótica (200 x), 10 e 30 m após o descongelamento (2). A motilidade entre diferentes tratamentos foi comparada por análise de variância, com posterior comparação entre médias pelo método LSD (16).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do congelamento, observou-se que o sêmen diluído sem a presença de crioprotetor extracelular durante a curva de resfriamento até 15°C (BTS), apresentou motilidade superior ( $P < 0,05$ ) aos tratamentos que continham crioprotetor, tanto PIGPEL-5, como o PIGPEL+ (Tabela 1). A substituição da gema de ovo por LDL não influenciou a motilidade ( $P > 0,05$ ). Após o descongelamento (Tabela 1) verificou-se a mesma tendência de motilidade superior tanto aos 10 m ( $P < 0,05$ ) como aos 30 m ( $P < 0,05$ ) no tratamento que não continha crioprotetor durante o resfriamento até 15°C, sendo que entre os tratamentos com a presença de crioprotetor não houve diferença ( $P > 0,05$ ). A presença de crioprotetor extracelular (gema de ovo ou LDL) durante a curva de resfriamento acima de 15°C não influenciou a motilidade do sêmen submetido à criopreservação. Após a retirada do plasma seminal e exposição da célula espermática a temperaturas abaixo de 15°C, é fundamental a presença de

crioprotetores extracelulares no diluente utilizado para resfriar o sêmen até 5°C (3, 17). A LDL presente na gema do ovo promove a entrada de fosfolípido e colesterol na membrana, além de formar um complexo com as proteínas do plasma seminal, prevenindo a saída de fosfolípido e colesterol da membrana espermática (3,11). Os diluentes PIGPEL-5 e PIGPEL+, que possuem crioprotetor extracelular em sua composição (6), possivelmente não influenciaram a viabilidade espermática, talvez pelo baixo conteúdo de gema de ovo e LDL, o que não possibilitou intensificar os mecanismos de proteção da LDL (3,17). Portanto, um maior inclusão de gema de ovo e LDL pode ser necessária, para aumentar a eficiência destes diluentes.

#### CONCLUSÕES

A presença de crioprotetor externo (gema de ovo ou LDL) no diluente utilizado durante a curva de resfriamento não influenciou a motilidade espermática do sêmen descongelado.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. Cap. 14, p.147-157.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. Cap. 15, p.159-170.
- BERGERON A; CRÊTE MH; BRINDLE Y; MANJUNATH P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**. 70, 708-717. 2004.
- BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology** 31, 224-238. 1994.
- BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. In: Johnson, L.A.; Rath, D. Eds.: **Boar Semen Preservation II. Proceedings II International Conference Boar Semen Preservation**. *Reprod. Domest. Anim. (Suppl. 1)*. Beltsville, Maryland USA. 81-93. 1991.
- CORRÊA, M.N.; LUCIA, T.JR; DESCHAMPS, J.C.; SERRET, C.G.; BORDIGNON, J.; RAMBO, G. Taxa de penetração espermática in vitro em ovócitos suínos utilizando espermatozoides acondicionados com o diluente PIGPEL-5 à 5°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 28, 161-169, 2004.
- DEMANIOWICZ W; STRZEZEK J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**. 31, 279-280. 1996.
- GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation*. Doorwerth, The Netherlands. **Theriogenology**. 63, 283-299. 2005.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**. 62, 143-172. 2000.
- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and where we go from here. In: JOHNSON, L.A., GUTHRIE, H.D. Eds. **Boar Semen Preservation. Proceedings IV International Conference on Boar Semen Preservation**. Beltsville, Maryland USA, 121-128, 2000.
- MANJUNATH P; NAUC V; BERGERON A; MENARD M. Major Proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology Reproduction**. 67, 1250-1258. 2002.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TANTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology** n. 57, p.1695-1706, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Swine**. 10<sup>th</sup> ed. National Academy Press, Washington, DC. 1998. 189p.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**. 60, 677-689. 2003.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, 40, 99-102. 1975.
- STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.
- WATSON PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **J Reprod Fert.**; 62, 483-492. 1981.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pilletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr**. 82, 261-267, 1975.

Tabela 1: Motilidade espermática pré e pós-descongelamento de acordo com o diluente utilizado

Diluente	Momento da Avaliação		
	Pré-Congelamento	Pós-Descongelamento	
		10 m	30 m
BTS	67,5 <sup>a</sup>	43,0 <sup>x</sup>	37,0 <sup>c</sup>
PIGPEL-5	62,5 <sup>b</sup>	34,1 <sup>y</sup>	32,3 <sup>d</sup>
PIGPEL+	63,0 <sup>b</sup>	33,3 <sup>y</sup>	31,0 <sup>d</sup>

Médias na coluna com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05)