

## CONGELAMENTO DE SÊMEN SUÍNO USANDO AMIDAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

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

<sup>1</sup>PIGPEL – Pesquisa, Ensino e Serviços em Produção de Suínos  
Departamento de Clínicas Veterinária, Hospital de Clínicas Veterinária, Campus Universitário s/nº,  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS/Brasil, CEP: 96010-900

**PALAVRAS-CHAVE:** Amidas, Crioprotetores, Criopreservação, Sêmen, Suínos

### INTRODUÇÃO

Apesar do sêmen suíno congelado estar disponível comercialmente desde 1975, o seu uso tem ocorrido somente em ocasiões específicas, como em casos de importação de genética, visando à produção de reprodutores (6). O uso de sêmen congelado requer duas a três vezes mais espermatozoides por dose, o tamanho da leitegada é diminuído em um a três leitões por parto e a taxa de parição é menor, o que inviabiliza economicamente seu uso em sistemas de produção, quando comparado ao uso de sêmen acondicionado resfriado na forma líquida (12). Com isso, os benefícios da tecnologia do uso de sêmen congelado ficam limitados (2). A ineficiência do congelamento do sêmen suíno é atribuída aos crioprotetores e diluentes utilizados, sugerindo que outras soluções crioprotetoras sejam testadas (9). Estudos com a utilização de amidas como crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos com obtenção de bons resultados (8). Entretanto, estes crioprotetores intracelulares não têm sido testados para sêmen suíno. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso das amidas: metilformamida (MF), dimetilformamida (DMF) e dimetilacetamida (DMA) como crioprotetores intracelulares em diferentes concentrações no congelamento de sêmen suíno.

### MATERIAIS E MÉTODOS

**Coleta do Sêmen:** Foram utilizados quatro machos suínos cruzados (Landrace x Large White) e coletado dez ejaculados de cada macho. As coletas foram realizadas através do método da mão-enluvada, usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel. Somente a porção do ejaculado com maior concentração espermática foi utilizada para o processo de congelamento (15). Após a coleta do ejaculado, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático por microscopia ótica de contraste de fases em aumento de 200x. Somente ejaculados com motilidade > 70% foram utilizados.

**Congelamento do sêmen:** Imediatamente após a coleta do sêmen foi obtida uma alíquota de 20 mL, em tubo cônico de 50 mL, e diluída (1:1, v/v) no diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) (11) e seguiu-se o protocolo de congelamento (15). Para o congelamento foram utilizados as amidas (MF, DMF e DMA) como crioprotetores intracelulares. Para cada tipo de amida foram utilizadas três concentrações: 3, 5 e 7%. Os diluidores de congelamento (MF 3, 5 e 7%; DMF 3, 5 e 7% e DMA 3, 5 e 7%) a serem adicionados a 5 °C foram elaborados a partir do diluidor de resfriamento, acrescido de 1,5% Orvus Ex Paste, Equex-Paste e respectivos crioprotetores para concentração final acima mencionada, v/v). O envase do sêmen foi feito em palhetas de 0,5 mL, com concentração final de  $500 \times 10^6$  espermatozoides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C até o descongelamento.

**Descongelamento das palhetas:** As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 20 s, sendo re-suspensas em tubo cônico contendo 10 mL de BTS previamente aquecido a 37 °C (1:20, v/v).

**Análise de motilidade:** Foi feita a incubação em banho-maria a 37 °C por 10 min e avaliados a motilidade (0 a 100 %) através de microscopia ótica com contraste de fases a 200 x (1).

**Análise da integridade de membrana espermática através de sonda fluorescente:** Após a avaliação da motilidade foi feita a avaliação da integridade de membrana espermática por fluorescência (4), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP). A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozoides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (espermatozoides corados em verde em toda sua extensão) e lesados (espermatozoides corados em vermelho).

**Análise estatística:** Para as variáveis dependentes: percentual de motilidade e espermatozoides com membrana íntegra no descongelamento foi gerada análise de variância pelo modelo linear através de medidas repetidas. Foram consideradas as variáveis independentes e possíveis interações entre elas. A comparação de médias foi feita no teste de Tukey e utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, para testar a correlação entre as técnicas de motilidade e integridade de membrana. Todas as análises foram através do mesmo programa estatístico (13).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No descongelamento foi encontrada interação entre o tipo de crioprotetor (MF, DMF ou DMA) e a concentração (3, 5 e 7%) utilizados, tanto na avaliação da motilidade do sêmen ( $P < 0,05$ ) assim como na integridade de membrana dos espermatozoides ( $P < 0,05$ ), cujos resultados estão apresentados na Tabela 1. O tratamento com DMA 5% é superior ( $P < 0,05$ ) tanto para motilidade como percentual de espermatozoides com membrana íntegra ao descongelamento em relação aos tratamentos MF3, 5 e 7%, DMF7% e DMA3%. Na motilidade ao descongelamento o DMA5% não difere ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos DMF5%, DMA7% e DMF3%, os quais também não diferem entre si ( $P > 0,05$ ). Para integridade de membrana de espermatozoides descongelados, os tratamentos DMA5% (50,9), DMF5% (47,9) e DMA7% (46,7), não diferem entre si ( $P > 0,05$ ). O coeficiente de correlação de Pearson foi altamente positivo e significativo ( $r = 0,92$ ,  $P < 0,0001$ ) entre as técnicas de integridade de membrana por fluorescência (CFDA e IP) e microscopia óptica. A dimetilacetamida é um crioprotetor largamente utilizado nos protocolos de criopreservação de espermatozoides de peixes (10) e de aves (14), trazendo benefícios a estas espécies na resposta pós-descongelamento. Em protocolos de criopreservação de espermatozoides de peixes a concentração de dimetilacetamida varia de 10 a 15% (10). Em um trabalho comparando crioprotetores e métodos de envase (pellets e palhetas), foi observado que o glicerol produziu uma menor alteração morfológica nos espermatozoides de galos em relação ao dimethyl sulfoxide (Me2SO) e a dimetilacetamida, diluídos em meios de congelamento com diferentes concentrações de crioprotetores (14). Porém, após o descongelamento das amostras na forma de pellets com dimetilacetamida, a fertilidade foi superior em relação às amostras de sêmen congeladas com glicerol. Os melhores resultados de motilidade obtidos neste estudo são comparáveis, ou mesmo superiores, aos obtidos por outros autores (3,5,12,16), e próximos a alguns dos melhores resultados já obtidos para sêmen suíno congelado (7), sendo que em todos estes trabalhos o crioprotetor utilizado sempre foi o glicerol.

## CONCLUSÃO

O uso de dimetilacetamida e dimetilformamida na concentração de 5% pode ser uma alternativa de crioprotetores para o congelamento de sêmen suíno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation, in: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Eds.), **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, p.159-170, 1997.
2. GERRITS, R.J. *et al.* Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations, **Theriogenology**. v.63, p.283-299, 2005.
3. GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm, **Theriogenology**. v.63, p.396-410, 2005.
4. HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, **J. Reprod. Fertil.** v.88, p.343-352, 1990.
5. HOLT, W.V. *et al.* The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope, **Theriogenology**. v.63, p.370-382, 2005.
6. JOHNSON, L.A.; LARSSON, K. Deep Freezing of Boar Semen. **Proceedings... I International Conference Boar Semen Preservation**. Uppsala, Sweden, 1985.
7. MALDJIAN, A. *et al.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, **Theriogenology**. v.63, p.411-421, 2005.
8. MEDEIROS, A.S.L. *et al.* Cryopreservation of stallion sperm using different amides, **Theriogenology**. v.58, p.273-276, 2002.
9. MEDEIROS, C.M.O. *et al.* Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, **Theriogenology**. v.57, p.327-344, 2002.
10. OGIER DE BAULNY, B. *et al.* Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants, **Cryobiology**. v.39, p.177-184, 1999.
11. PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, **J. Anim. Sci.** v.40, p.99-102, 1975.
12. SARAIVA, F. *et al.* Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability, **Theriogenology**. v.63, p.1320-1333, 2005.
13. STATISTIX®. Statistix for Windows User's Manual. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.
14. TSELUTIN, K. *et al.* Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa, **Poultry Sci.** v.78, p.586-590, 1999.
15. WESTENDORF, P. *et al.* Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren, **Dtsch. Tierarztl. Wschr.** v.82, p.261-267, 1975.
16. WONGTAWAN, T. *et al.* Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses, **Theriogenology**. v.65, p.773-787, 2006.

**Tabela 1:** Motilidade e integridade de membrana após o descongelamento

Tratamento	Motilidade, %	Integridade de membrana, %
DMA5%	53,8 <sup>a</sup>	50,9 <sup>a</sup>
DMF5%	50,6 <sup>ab</sup>	47,9 <sup>ab</sup>
DMA7%	48,9 <sup>abc</sup>	46,7 <sup>abc</sup>
DMF3%	47,9 <sup>abc</sup>	46,3 <sup>bcd</sup>
DMA3%	46,6 <sup>bc</sup>	45,2 <sup>bcd</sup>
MF3%	44,3 <sup>c</sup>	43,4 <sup>cd</sup>
DMF7%	44,1 <sup>c</sup>	42,3 <sup>d</sup>
MF5%	43,2 <sup>c</sup>	43,3 <sup>cd</sup>
MF7%	34,8 <sup>d</sup>	34,7 <sup>e</sup>

Médias na coluna seguidas de diferentes letras diferem ( $P < 0,05$ )