

EFEITO DO USO DE GEMA DE OVO E LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

Bianchi, I.^{1*}; Calderam, K.¹; Maschio, E.F.¹; Madeira, E.M.¹; Ulguim, R.R.¹; Corrêa, E.K.¹; Corcini, C.D.¹; Lucia, T.Jr.¹; Deschamps, J.C.¹; Corrêa, M.N.¹

¹PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos. Centro de Biotecnologia - UFPEL, Campus Universitário s/n, CEP 96010-900, Pelotas, RS. *E-mail: ivan.bianchi@pfizer.com

PALAVRAS CHAVE: Crioprotetor extracelular, Lipoproteína de baixa densidade, Sêmen, Suíno.

INTRODUÇÃO

O congelamento do sêmen é uma biotécnica reprodutiva importante para aumentar a eficiência de produção dos rebanhos, especialmente devido ao uso em maior escala nos programas de inseminação artificial (IA) de animais geneticamente superiores (5). No entanto, a expansão da IA em suínos tem sido limitada devido à baixa fertilidade da célula espermática de suínos após o descongelamento. A gema de ovo é amplamente utilizada nos protocolos de congelamento de sêmen (4, 13). Trabalhos com o uso de lipoproteína de baixa densidade (LDL), na composição de diluentes utilizados para sêmen foram testados em diferentes espécies (9, 12). A substituição da gema de ovo por LDL foi benéfica para a manutenção da qualidade espermática em sêmen de cães, quando preservado a temperatura de refrigeração a 5°C ou congelado (12). Enquanto que, LDL na concentração de 8%, pode substituir a gema de ovo na composição do diluente utilizado para criopreservar sêmen equino (9). O objetivo deste trabalho foi comparar o uso de gema de ovo e de LDL, na composição dos diluidores de resfriamento (DR) e congelamento (DC) utilizados na criopreservação de sêmen suíno, sobre parâmetros de avaliação espermática *in vitro* de sêmen congelado-descongelado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis machos suínos cruzados (Landrace x Large White), com aproximadamente 18 meses de idade, que apresentavam fertilidade conhecida. Para cada macho foram realizadas 10 coletas, feitas através do método da mão-enluvada. Imediatamente após a coleta do sêmen, para cada macho foram coletadas duas alíquotas de 20 ml da fração rica em espermatozoides (SPTZ), sendo diluídas (1:1, v/v) em tubo cônico de 50 ml com BTS (8). O método de congelamento foi o descrito por Westendorf *et al.* (13) e Bordignon *et al.* (4), com modificações feitas por Bianchi *et al.* (2, 3). O tratamento utilizado como controle foi preparado utilizando-se a gema de ovo como crioprotetor extracelular. Na curva de resfriamento, após a diluição inicial, os frascos permaneciam 60 min a 24 °C e, após, 60 min a 15 °C. Ao atingirem 15 °C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 min), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de SPTZ obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (DR) GEMA utilizado como controle (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20% gema de ovo, v/v) e no DR LDL (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20% LDL, v/v), para uma concentração de 450 x 10⁶ SPTZ/ml. A LDL foi obtida através de protocolo descrito por Moussa *et al.* (10). Após realizou-se o resfriamento por 90 min a 5 °C. Os tratamentos GEMA e LDL foram re-suspenso quando atingiram 5 °C no diluidor de congelamento GEMA a base do crioprotetor intracelular dimetilacetamida (DMA) (83,5% de DR GEMA + 1,5% Orvus Ex Paste, Equex-Paste e 15% DMA, v/v) e no diluidor de congelamento LDL também a base do crioprotetor DMA (83,5% de DR LDL + 1,5% Orvus Ex Paste, Equex-Paste e 15% DMA, v/v). As concentrações finais foram de 300 x 10⁶ SPTZ/ml e 5% de DMA. Após a adição do diluidor de congelamento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, com 150 x 10⁶ SPTZ/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 20 min, sendo após armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C. O descongelamento das palhetas foi realizado a 37 °C por 20 s em banho-maria com circulação de água. As palhetas foram re-suspenso (1:20, v/v) em tubos cônicos de 15 ml, no diluente BTS incubado a 37 °C. As variáveis dependentes consideradas foram: percentual de motilidade, espermatozoides com membrana íntegra no descongelamento no teste da fluorescência e para o choque hiposmótico (CHIPO). Foi gerada análise de variância pelo modelo linear através de medidas repetidas, a fim de isolar o efeito de cada coleta e de cada macho sobre os parâmetros avaliados. A comparação de médias foi feita no teste de Tukey. Todas as análises foram através do programa Statistix® (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações de motilidade, SPTZ com membrana íntegra na fluorescência e membrana reagida no choque hiposmótico após o descongelamento, estão apresentados na Tabela 1. O uso de gema de ovo na composição dos diluidores de congelamento e resfriamento proporcionou melhores resultados (P < 0,05) após o congelamento para motilidade e integridade de membrana avaliada por fluorescência em relação ao uso de LDL, mas não diferiu (P > 0,05) na integridade de membrana pelo choque hiposmótico. Moussa *et al.* (10), determinaram a inclusão de LDL em 8% para o congelamento de sêmen de touro. Estudos de criopreservação de sêmen de cães (12) e de garanhão (9), também estabeleceram a utilização de 8% de LDL. Trabalho com uso de LDL na criopreservação de sêmen suíno foi realizado por Hu *et al.* (7). Esses autores encontraram que a concentração de 9% de LDL determinou os melhores resultados de motilidade e integridade de acrossoma e membrana. Neste estudo, o percentual de inclusão de LDL no diluidor de resfriamento foi de 6% enquanto que no diluidor de congelamento foi de 5%. Dessa forma, o uso de LDL nos diluidores em substituição a gema de ovo, possivelmente não influenciou a viabilidade

espermática devido à baixa inclusão do crioprotetor, em relação aos 9% estabelecidos em outro trabalho (7). He *et al.* (6), obtiveram redução na sensibilidade de espermatozoides suínos submetidos à criopreservação, através da incorporação de microvesículas de lipídios específicos na forma de lipossomas. Além disso, Bergeron *et al.* (1) demonstraram que o tempo mínimo de incubação do sêmen com LDL deve ser de 4 h, a fim de que a lipoproteína possa interagir com a membrana celular. Dessa forma, além do baixo percentual de inclusão de LDL neste estudo, o uso da molécula complexa de lipoproteína ao invés do uso de microvesículas e o curto período de incubação do sêmen na presença dos diluidores com LDL, 1,5 h ao invés das 4 h preconizadas, são as hipóteses para que não tenha se observado os benefícios crioprotetores da fração de lipoproteína.

CONCLUSÕES

Neste estudo o uso de gema de ovo ao invés de LDL como crioprotetor extracelular na composição dos diluidores de resfriamento e congelamento, proporcionou melhores resultados de motilidade e integridade de membrana plasmática de espermatozoides suínos criopreservados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; 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 of Reproduction**. v.70, p.708-717, 2004.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORRÊA, E.K.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Uso de diferentes crioprotetores no congelamento de sêmen suíno. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006a, CD-ROM.
- BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORRÊA, E.K.; PERONDI, A.; LUCIA, T.JR.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Congelamento de sêmen suíno usando amidas em diferentes concentrações. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006b, CD-ROM.
- BORDIGNON, V.; DESCHAMPS, J.C.; SECHIN, A.; PALUDO, G.; VIVIAN, J.C.; NICOLA, E.; BOZZATO, J.S.; GONSALES, J. A.; PIMENTEL, C.A. Effect of trehalose on motility, acrosome and fertility of the frozen-thawed boar semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.20, p.54-62, 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. **Theriogenology**. v.63, p.283-299, 2005.
- HE, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**. v.64, p.69-79, 2001.
- HU, J.-H.; LI, Q.-W.; LI, G.; CHEN, X.-Y.; YANG, H.; ZHANG, S.-S.; WANG, L.-Q. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Asian-Aust. Journal of Animal Science**. v.19, p.486-490, 2006.
- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville, 2000, p.121-128.
- MARTIN, C.E.G. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen **Theriogenology**. v.57, p.1695-1706, 2002.
- STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee, FL. 2004.
- VARELA JUNIOR, A.S. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr.** v.82, p.261-267, 1975.

Tabela 1. Resultados de motilidade e integridade de membrana do sêmen descongelado.

Avaliação	GEMA	LDL
Motilidade, %	53,7 ^a	37,3 ^b
SPTZ com membrana íntegra na fluorescência, %	49,0 ^a	43,7 ^b
SPTZ com cauda reagida no choque hiposmótico, %	32,7 ^a	30,2 ^a

^{a, b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P < 0,05)