

COMPARAÇÃO DE CRIOPROTETORES EXTRACELULARES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

BIANCHI, Ivan¹; MASCHIO, Éder Francisco¹; CALDERAM, Kérlin¹; MADEIRA, Elisângela Mirapalheta¹; CORRÊA, Érico Kunde¹; ULGUIM, Rafael da Rosa¹; COLARES, Tiago²; CORRÊA, Marcio Nunes¹.

¹ *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

² *EMTA: Grupo de Pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal.*

1. 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 (Johnson et al., 2000).

O congelamento do sêmen é uma biotécnica reprodutiva importante para aumentar a eficiência de produção dos rebanhos, especialmente devido ao uso em maior escala de animais geneticamente superiores (Gerrits et al., 2005). A fim de proteger a célula espermática das injúrias provocadas pelo processo de congelamento e descongelamento, há necessidade de utilizar substâncias no meio diluidor cuja função principal é proteger os espermatozoides. Estas substâncias são denominadas agentes crioprotetores e são classificados como penetrantes (intracelulares) e não penetrantes (extracelulares). Os agentes crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são macromoléculas (alto peso molecular) representadas por açúcares, proteínas, lipídios e alguns aminoácidos. Nos protocolos de congelamento, a gema de ovo é usualmente adicionada aos diluidores, com a finalidade de proteger a membrana da célula espermática das injúrias provocadas por baixas temperaturas, especialmente abaixo de 15°C (Westendorf et al., 1975). O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Bergeron et al., 2004). A ação crioprotetora da LDL purificada da gema de ovo sobre a preservação de sêmen suíno foi demonstrada por Demaniowicz & Strzezek (1996). A LDL purificada promove a entrada de fosfolipídio e colesterol na membrana, além de formarem um complexo com as proteínas do plasma seminal prevenindo a saída de fosfolipídio e colesterol da membrana plasmática.

O objetivo deste trabalho foi comparar o uso de LDL e gema de ovo na composição dos diluidores de resfriamento e congelamento utilizados na criopreservação de sêmen suíno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis machos 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. Para cada macho foram realizadas 10 coletas, feitas através do método da mão-enluvada (Bearden & Fuquay, 1997a), 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, 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, em BTS (pH de 7,2; osmolalidade de 357) (Pursel & Johnson, 1975).

O método de congelamento foi o descrito por Westendorf et al. (1975) e Bordignon et al. (1996), com modificações feitas por Bianchi et al. (2005a; 2005b). Na curva de resfriamento, após a diluição inicial, os frascos permaneciam 60 m a 24°C e, após, 60 m a 15°C. Ao atingirem 15°C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 m), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de SPTZ obtido da centrifugação foi re-suspensão no diluidor de resfriamento (DR) GEMA (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo; pH de 6,1; osmolalidade de 381) e no DR LDL (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, LDL; pH de 6,1; osmolalidade de 431), para uma concentração de $1,5 \times 10^9$ SPTZ/mL. A LDL foi obtida através de protocolo descrito por Moussa et al. (2002). Após realizou-se o resfriamento por 90 m a 5°C. Aos 5°C, os tratamentos GEMA e LDL foram re-suspensos 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; pH de 6,85 e osmolalidade de 3.337) e no diluidor de congelamento LDL também a base de DMA (83,5% de DR LDL + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 15% DMA, v/v; pH de 6,61 e osmolalidade de 3.323). As concentrações finais foram de $1,0 \times 10^9$ SPTZ/mL e 5% de DMA.

Após a adição do diluidor de congelamento o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 500×10^6 SPTZ/palheta. 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 37°C por 20 s em banho-maria com circulação de água. As palhetas foram re-suspensas (1:20, v/v) em tubos cônicos de 15 mL (Peña et al., 2003), no diluente BTS incubado a 37°C.

A avaliação da motilidade espermática foi realizada através de microscopia ótica (200 x), 10 m após o descongelamento (Bearden & Fuquay, 1997b). Após a avaliação da motilidade foi feita a avaliação da integridade de membrana plasmática dos SPTZ por fluorescência (Harrison & Vickers, 1990), 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). A integridade funcional da membrana espermática foi testada também através do teste do choque hiposmótico (CHIPO) (Vasquez et al., 1997). A avaliação foi feita utilizando-se câmara de Neubauer e microscopia ótica com contraste de fases, em aumento de 400x, procedendo-se à contagem de 100 células, registrando o número de células que apresentavam cauda do espermatozoide normal a àquelas que estavam dobrada ou enrolada. O valor que foi utilizado para análise do CHIPO, correspondeu à diferença obtida entre o número de espermatozoides com cauda dobrada e enrolada, observadas no teste realizado com a solução hiposmótica (75 mOsm/kg) e isosmótica (312 mOsm/kg).

As variáveis dependentes consideradas foram: percentual de motilidade, espermatozoides com membrana íntegra no descongelamento no teste da fluorescência e para o 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 Statistix® (2004).

3. 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.

Tabela 1. Resultado das avaliações realizadas nas amostras de sêmen descongelado.

Avaliação	Diluidores	
	GEMA	LDL
Motilidade, %	53,7 a	37,3 b
SPTZ com membrana íntegra na fluorescência, %	59,0 a	43,7 b
SPTZ com cauda reagida no choque hiposmótico, %	32,7 a	30,2 b

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

O uso de gema de ovo como crioprotetor extracelular nos diluidores de resfriamento e congelamento proporcionou melhores resultados ($P < 0,05$) dos parâmetros avaliados ao invés do uso de lipoproteína de baixa densidade. Bergeron et al. (2004) e Manjunath et al. (2002) mostraram que 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. O uso de LDL nos diluidores em substituição a gema de ovo, possivelmente não influenciou a viabilidade espermática, talvez pela pequena inclusão, o que não possibilitou intensificar os mecanismos de proteção propostos por Bergeron et al. (2004) e Manjunath et al. (2002). Portanto, um maior inclusão de LDL pode ser necessária a fim de verificar o efeito proposto na bibliografia.

4. CONCLUSÕES

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 submetidos a crioreservação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997a. Cap. 14, p.147-157.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997b. 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.

BIANCHI, I., CORRÊA, M. N., PIASSI, L. M., LUCIA, T. JR., CORRÊA, E. K., MADEIRA, E. M., PERONDI, A., CORCINI, C. D., COREZZOLLA, J. L., DESCHAMPS, J. C. Efeito de diferentes métodos de congelamento sobre a motilidade de sêmen suíno. In: **XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos Fortaleza**. Fortaleza : Associação Brasileira dos Veterinários Especialistas em Suínos, v. 2. p. 273-274, 2005b.

BIANCHI, P.G., MANCARDI, G.C., BIZZARO, D., BIANCHI, U., SAKKAS, D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. **Biol. Reprod.** 49, 1083-1088, 1993.

BORDIGNON, V., DESCHAMPS, J.C., SECHIN, A., PALUDO, G., VIVIAN, J.C., NICOLA, E., BOZZATO, J.S., GONSALES, J. A., PIMENTEL, C.A. Efeito da trealose sobre a motilidade, acrossomo e fertilidade do sêmen de suínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 20, n. 2, 54-62, 1996.

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.

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.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**. 62, 143-172. 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.; TAINURIER, 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.

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.

VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr.** 82, 261-267, 1975.