



## INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PÓS-CERVICAL DE LEITOAS COM SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO UTILIZANDO DIMETILACETAMIDA E GLICEROL

**Autor(es):** MADEIRA, Elisângela Mirapalheta; CALDERAM, Kérlin; MASCHIO, Éder Francisco; RAMBO, Gissele; BIANCHI, Ivan; LUCIA JR., Thomaz; Deschamps, João Carlos; CORRÊA, Marcio Nunes

**Apresentador:** Elisângela Mirapalheta Madeira

**Orientador:** Marcio Nunes Corrêa

**Revisor 1:** Eduardo Xavier

**Revisor 2:** Vinicius Pereira

**Instituição:** Universidade Federal de Pelotas

## INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PÓS-CERVICAL DE LEITOAS COM SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO UTILIZANDO DIMETILACETAMIDA E GLICEROL

**MADEIRA, Elisângela Mirapalheta<sup>i</sup>; CALDERAM, Kérlin<sup>ii</sup>; MASCHIO, Éder Francisco<sup>ii</sup>; RAMBO, Gissele<sup>ii</sup>; BIANCHI, Ivan<sup>i</sup>; LUCIA JR., Thomaz<sup>ii</sup>; Deschamps, João Carlos<sup>ii</sup>; CORRÊA, Marcio Nunes<sup>i</sup>**

<sup>i</sup>Faculdade de Veterinária, Depto de Clínica Veterinária, UFPel  
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)  
<sup>ii</sup>PIGPEL – Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária - UFPel  
Campus Universitário – 96010 900 - Pelotas/RS - [www.ufpel.edu.br/nupeec](http://www.ufpel.edu.br/nupeec)  
E-mail: [elisangelamadeira@bol.com.br](mailto:elisangelamadeira@bol.com.br) - Tel: (53) 32782782

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de sêmen suíno congelado determina a queda de 20 a 30% na taxa de parição e dois a três leitões a menos por leitegada. Dessa forma, a sua utilização fica condicionada apenas a situações específicas, tais como a produção de reprodutores em núcleos genéticos.

O glicerol é normalmente o crioprotetor de eleição para o congelamento de sêmen na maioria das espécies de mamíferos. Estudos com a utilização de crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos especialmente em eqüinos com o uso de diferentes amidas (ALVARENGA *et al.*, 2000).

No emprego de sêmen congelado através da IA intracervical, normalmente são utilizadas doses de  $5-6 \times 10^9$  SPTZ (BORDIGNON *et al.*, 1996; ROGA *et al.*, 2003), o que é consideravelmente superior a dose convencional de  $3 \times 10^9$  SPTZ utilizada com sêmen refrigerado (SERRET *et al.*, 2005). A melhora nos resultados obtidos é resultante da adaptação de protocolos de criopreservação, além do desenvolvimento

de novos métodos de IA, tais como o intra-uterino profundo, utilizando doses de até  $150 \times 10^6$  SPTZ.

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso da dimetilacetamida (DMA) e glicerol na criopreservação de sêmen suíno, sobre as taxas de concepção e fertilização *in vivo*, utilizando o método de inseminação artificial pós-cervical.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado sêmen de machos suínos cruza (Landrace x Large White), em regime de coleta e mantidos no Centro Agropecuário da Palma (Universidade Federal de Pelotas-RS). O ejaculado foi coletado através do método da mão-enluvada (BEARDEN e FUQUAY, 1997a). A condição mínima para o ejaculado ser processado foi de motilidade espermática e integridade de membrana por fluorescência superior a 80% e 70%, respectivamente, no momento da coleta.

Após a coleta, o sêmen foi diluído (1:1, v/v), no diluente BTS. O resfriamento foi de 60 min a 24°C e, após, 60 min a 15°C. Ao atingir 15°C foi realizada a centrifugação ( $800 \times g$  por 10 min) para a retirada do plasma seminal. O sedimento de (SPTZ) obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (DR) GEMA (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20% gema de ovo, v/v), num volume suficiente para que cada mL mantivesse uma concentração de  $450 \times 10^6$  de SPTZ. O resfriamento foi por 90 min até 5°C, e re-suspenso nos diluidores de congelamento (DC) a base dos crioprotetores Glicerol e DMA.

Os DC foram elaborados a partir do DR, sendo o DC composto de glicerol (89,5% de DR GEMA + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 9% de Glicerol, v/v), e o DC dimetilacetamida (83,5% de DR GEMA + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 15% de DMA, v/v). A quantidade de DC acrescentada foi de 1:2, onde nesta proporção obteve-se uma concentração final de 3% para o congelamento com glicerol e a 5% para DMA, seguida da adição do DC.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com uma concentração de  $150 \times 10^6$  SPTZ/palheta. As palhetas foram congeladas a uma temperatura aproximada de -90°C por um período de 20 min, sendo após mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C e mantidas até o descongelamento.

As avaliações *in vitro* do sêmen foram de motilidade (0 a 100 %) e vigor, através de microscopia ótica. Após foi feita a avaliação da integridade de membrana espermática por fluorescência (HARRISON e VICKERS, 1990) através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP).

A integridade funcional da membrana espermática foi testada também através do teste do choque hiposmótico (CHIPO) (VASQUEZ *et al.*, 1997).

A avaliação da capacidade fertilizante *in vivo* do sêmen congelado com glicerol e DMA, foi realizada em 60 leitoas pré-púberes (30 para cada grupo) com peso médio de 86,5 kg e idade de 155 d. As fêmeas foram tratadas com 1000 UI de eCG (sendo considerado hora 0) e 70-72 h após com de 500 UI de hCG (CORRÊA *et al.*, 2006). Entre 31-34 h após a aplicação do hCG as leitoas foram inseminadas ao acaso, independente dos sinais de cio e abatidas entre 36 a 40 h após a IA.

Para elaboração das doses inseminantes de 60 mL, foi realizado o descongelamento das palhetas do tratamento correspondente (glicerol ou DMA) em banho-maria a 37°C por 20 s imediatamente antes de cada IA em BTS na temperatura

de 37°C, a fim de atingir uma concentração de  $1 \times 10^9$  SPTZ vivos (baseados na análise prévia da motilidade espermática).

O método de IA utilizado foi o pós-cervical, cuja pipeta é fixada na cérvix e possui um cateter com um prolongamento de 20 cm, o que permite a deposição do sêmen no corpo do útero (SERRET *et al.*, 2005).

Nos aparelhos reprodutivos das fêmeas foi determinada individualmente a taxa de ovulação, a partir da contagem do número de corpos hemorrágicos em cada ovário. Para a coleta das estruturas (oócitos e embriões), cada oviduto (direito e esquerdo) foi lavado com 20 mL de PBS (solução de tampão fosfato).

Para cada fêmea foram determinadas as taxas de recuperação (TR) e fertilização (TF), a partir das seguintes fórmulas:

- Taxa de recuperação (TR,%) =  $(n^\circ \text{ de oócitos e/ou embriões recuperados} / n^\circ \text{ de corpos hemorrágicos contados}) \times 100$

- Taxa de fertilização (TF,%) =  $(n^\circ \text{ de embriões} / n^\circ \text{ de estruturas recuperadas}) \times 100$

A taxa de concepção foi determinada considerando o número de fêmeas em que foi verificada a presença de embriões em relação ao total de fêmeas inseminadas.

As análises estatísticas descritivas foram calculadas para as avaliações espermáticas *in vitro*, manifestação de cio, número de corpos hemorrágicos, oócitos, embriões, taxa de recuperação e fertilização.

A análise de concepção entre os grupos glicerol e DMA foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. As variáveis dependentes consideradas na análise de variância foram: número de corpos hemorrágicos; oócitos; embriões; taxas de recuperação e fertilização. A variável independente considerada foi o crioprotetor utilizado (glicerol ou DMA). A comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas através do STATISTIX® (2004).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Parâmetros de avaliação do sêmen após a coleta e após o congelamento.

Parâmetro avaliado	Momento da avaliação		
	Pós-coleta	Pós-descongelado	
		Glicerol	DMA
Motilidade, %	85,0	53,0	65,0
Integridade de membrana por fluorescência, %	77,0	45,0	53,0
Integridade de membrana pelo CHIPO*, %	35,0	26,0	28,0

Os resultados de avaliação *in vitro* do sêmen após a coleta e após o descongelamento mostram o quanto é sensível o espermatozóide suíno ao processo de congelamento-descongelamento. A comparação entre os crioprotetores glicerol e DMA nas avaliações, evidencia a superioridade dos resultados de motilidade e integridade de membrana por fluorescência, obtidos no tratamento com DMA. Para a elaboração das doses inseminantes foi utilizado o resultado de motilidade obtido após o descongelamento (Tabela 2), calculando-se dessa forma a quantidade de palhetas utilizadas a fim de atingir  $1 \times 10^9$  SPTZ viáveis por dose.

Em todas as fêmeas utilizadas no trabalho foram encontrados folículos pré-ovulatórios e/ou corpos hemorrágicos, demonstrando que todas responderam ao protocolo hormonal utilizado.

**Tabela 2.** Taxa de recuperação de estruturas e efeito do tratamento sobre a fertilidade.

Parâmetro	Tratamento	
	Glicerol 3%	DMA 5%
Leitoas inseminadas	30	30
Corpos hemorrágicos	306	299
Taxa de recuperação, %	68,9	66,9
Taxa de concepção, %	73,3	76,6
Taxa de fertilização, %	48,6	59,4

Os dados não diferem ( $P > 0,05$ ).

Não houve diferença entre os grupos glicerol e DMA na taxa de concepção ( $P > 0,05$ ), e os resultados se assemelharam aos relatados com o uso de sêmen congelado. A taxa de fertilização do grupo glicerol é comparável à obtida por BORDIGNON *et al.* (1996). Além disso, destacam-se os resultados obtidos através do uso de DMA, pois a maioria dos trabalhos utilizando sêmen suíno congelado baseia-se no uso de glicerol. Não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de fertilização entre os grupos glicerol e DMA. No entanto o grupo DMA foi superior 10% em relação ao glicerol, além do que possui uma tendência de maior taxa de concepção. Além disso, há que se enfatizar os resultados da avaliação espermática pós-descongelamento. Baseado nas avaliações de motilidade a fim de elaborar as doses inseminantes, foram necessárias 10 palhetas do tratamento DMA, enquanto que para atingir a mesma concentração foram utilizadas 13 palhetas de glicerol. Essa diferença de 30% torna o processo com o uso de DMA mais eficiente, resultando em um melhor aproveitamento do ejaculado.

Os resultados deste estudo sugerem que a DMA pode ser utilizada como substituto ao glicerol em protocolos para congelamento de sêmen suíno.

#### 4. CONCLUSÕES

Não há diferença nas taxas de concepção e fertilização *in vivo* de fêmeas suínas inseminadas pelo método pós-cervical, utilizando sêmen congelado com o uso de dimetilacetamida ou de glicerol.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, S.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION*, 14, Stockholm, 2000. **Proceedings...** Stockholm, 2000, p.157.  
 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, 1997a. Cap. 14, p.147-157.

BORDIGNON, V. *et al.* 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.

CORRÊA, M.N. *et al.* Swine semen cooled at 5 °C with PIGPEL-5 extender: effects on parameters of semen quality in vitro and fertility estimators in vivo. **Animal Reproduction**, v.3, p.41-48, 2006.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproductive and Fertility**. 88, p.343-352, 1990.

ROCA, J. *et al.* Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.77-87, 2003.

SERRET, C.G. *et al.* Intrauterine artificial insemination in female swine with distinct sperm concentrations, parities and methods of ovulation estimation. **Animal Reproduction**, v.2, p.250-256, 2005.

STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.

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