

A MOTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO CONGELADO EM DIFERENTES TEMPOS DE DESCONGELAMENTO

COREZZOLLA, José Luís¹; BIANCHI, Ivan¹; CORRÊA, Márcio Nunes¹; PANZARDI, Andrea¹; MARTINS, Naiana Oliveira¹; CORRÊA, Érico Kunde¹; ULGUIM, Rafael da Rosa¹

¹ PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos, Cenbiot-UFpel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 joseluis@ufpel.edu.br (53) 91315164

1. INTRODUÇÃO

Apesar do uso de sêmen suíno congelado ter sido disponibilizado desde 1975, o seu uso não é difundido, em função da obtenção de taxas de parição de 50-70% e de um total de 7-10 leitões nascidos por leitegada, o que é consideravelmente inferior aos índices obtidos com sêmen resfriado. Além disso, doses inseminantes de sêmen congelado exigem concentrações de espermatozóides duas a três vezes maiores do que com sêmen resfriado, para compensar os possíveis danos celulares associados ao congelamento [5, 11, 18]. Os resultados insatisfatórios obtidos com sêmen suíno congelado levam a busca de novos métodos de congelamento utilizando-se diferentes protocolos, assim como substâncias crioprotetoras que possuam propriedades capazes de minimizar os danos causados pela criopreservação e conseqüentemente melhorar os resultados de fertilidade. Outro fator limitante para a expansão do uso de sêmen suíno congelado é a grande variabilidade de características do sêmen entre indivíduos, sendo que em alguns reprodutores os espermatozóides se mostram mais resistentes ao congelamento do que outros [19, 22]. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tempos de descongelamento sobre a motilidade de sêmen suíno congelado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois machos (A e B) suínos cruzados (Landrace x Large White), sendo coletado dez ejaculados de cada macho. As coletas foram realizadas 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. Somente a porção do ejaculado com a maior concentração espermática foi utilizada para ser criopreservada. As porções menos concentradas foram descartadas. Após a coleta do ejaculado, a concentração de células espermáticas foi realizada através do hematocítômetro. Também foi avaliada a motilidade espermática (0 a 100%), por microscopia ótica em aumento de 200x [2]. Somente ejaculados com motilidade > 70% foram utilizados. A motilidade foi usada como parâmetro de avaliação, em função ser um bom indicador de integridade e funcionalidade das membranas celulares [6], apresentar boa correlação com o número de espermatozóides por ovócito penetrado [9], taxa de fertilização *in vivo* [3] e taxa de parição e tamanho total de leitegada [7]. Imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota de 10 ml da fração rica em espermatozóides foi diluída em BTS [15] (1:1, v/v) em tubo cônico de 50 ml. Foi realizado o resfriamento durante 90 minutos à 20°C e, após, 180 minutos à 15°C. Após atingir 15°C, os tratamentos foram submetidos à centrifugação (800 x g por 10 minutos), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de espermatozóides 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 $1,5 \times 10^9$ espermatozóides/ml [20]. Após, 2 ml da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 ml, realizando-se o

resfriamento por 90 minutos à 5°C. Aos 5°C, os tubos cônicos com 2 ml de espermatozóides diluídos foram re-suspensos 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 $1,0 \times 10^9$ espermatozóides/ml e 3% de glicerol. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml (Minitüb, Germany), com concentração de 500×10^6 espermatozóides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 minutos, sendo após estocadas em nitrogênio líquido à -196°C. Para o descongelamento das palhetas foram utilizadas duas curvas de descongelamento: Padrão (50°C por 40 s) e Curta (37°C por 20 s), em banho-maria com circulação de água. As palhetas foram re-suspensas (1:10, v/v) em tubos cônicos de 15 ml [14] com BTS e incubados à 37°C. A avaliação da motilidade espermática foi realizada através de microscopia ótica (200 x), 10 e 30 minutos após o descongelamento. A motilidade entre diferentes tratamentos foi comparada por análise de variância, com posterior comparação entre médias pelo método LSD. Todas análises foram realizadas com o software Statistix® (2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade pós-descongelamento foi superior ($P < 0,05$) na curva de descongelamento curta em relação à curva padrão, após 10 minutos (42,2% e 31,1%, respectivamente) e 30 minutos (37,4% e 29,4%, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1. Motilidade espermática pré e pós-descongelamento de acordo com o tempo de descongelamento.

Tempo de descongelamento	Momento da avaliação		
	Pré-Congelamento	Pós-descongelamento	
		10 minutos	30 minutos
Padrão (50° C - 40 s)	64,2 ^a	31,1 ^x	29,4 ^c
Curto (37° C - 20 s)	64,2 ^a	42,2 ^y	37,4 ^d

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

Os tratamentos que apresentaram os menores valores de motilidade pós-descongelamento foram àqueles cuja curva de descongelamento foi a padrão, com descongelamento das palhetas a 50°C durante 40 s. Os prejuízos observados podem ser decorrentes da temperatura demasiadamente elevada ou do tempo excessivo em que a célula espermática ficou exposta à temperatura de 50°C. Os melhores resultados de motilidade obtidos em nosso estudo são comparáveis, ou mesmo superiores, aos obtidos em alguns estudos [8, 10, 16] porém inferiores aos descritos por Maldjian *et al.* (2005). Neste estudo, houve redução na motilidade na avaliação realizada após a exposição das palhetas de sêmen congelado a temperatura de 50°C por 40 s no descongelamento. Este efeito pode ser atribuído a danos irreversíveis na célula espermática em função do choque térmico que ocorre durante o processo de congelamento e descongelamento e, também, ao choque osmótico provocado pelas altas concentrações intracelulares de sais, resultantes do processo de desidratação a que a célula é submetida [21].

4. CONCLUSÕES

A curva de descongelamento à 50°C por 40 s, foi associada a redução na motilidade do sêmen descongelado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. Cap. 14, p.147-157.
- [2] BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. Cap. 15, p.159-170.
- [3] BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**. 60, 1539-1551. 2003.
- [4] BUHR, M.M.; HE, L.; KASIMANICKAM, V. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. In: Johnson, L.A.; Guthrie, H.D. Eds.: Boar Semen Preservation IV. **Proceedings IV International Conference Boar Semen Preservation**. Beltsville, Maryland USA, 61-69. 2000.
- [5] ERIKSSON, B.; PETERSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Individual boar fertility after AI with frozen-thawed semen in relation to in vitro sperm motility and viability. In: **Sixth International Conference on Pig Reproduction**. University of Missouri-Columbia. Abstracts p. 54. 2001.
- [6] GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation. Doorwerth, The Netherlands. **Theriogenology**. 63, 431-444. 2005.
- [7] GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**. 39, 1-6. 2004.
- [8] GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation. Doorwerth, The Netherlands. **Theriogenology**. 63, 396-410. 2005.
- [9] HAMMITT, D.G.; MARTIN, P.A.; CALLANAN, T. Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. **Theriogenology**. 32, 385-399. 1989.
- [10] HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation. Doorwerth, The Netherlands. **Theriogenology**. 63, 370-382. 2005.
- [11] JOHNSON, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. In: Johnson, L.A. and Larsson, K. Eds. Deep Freezing of Boar Semen. **Proceedings I International Conference on Deep Freezing of Boar Semen**. Uppsala, Sweden. p. 199-222. 1985.
- [12] KUSTER, C.E.; ALTHOUSE, G.C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep® and X-Cell™ extenders. **Theriogenology**. 52, 365-376. 1999.
- [13] MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar

semen. Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation. Doorwerth, The Netherlands. **Theriogenology**. 63, 411-421. 2005.

[14] 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.

[15] 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.

[16] ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**. v. 60, p. 77-87. 2003.

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

[18] WAGNER, H.G.; THIBIER, M. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. *In: Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction*, 2; 77 (abstract). 2000.

[19] WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesement of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**. 7, 871-891, 1995.

[20] 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.

[21] WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ZUIDBERG, C.A.; CHAVEIRO, A.E.N. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation. Doorwerth, The Netherlands. **Theriogenology**. 63, 383-395. 2005.

[22] WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; DEN BESTEN, N. Boar variation in "freezability" of the semen. **Reproduction in Domestic Animals**. 31 (1), 153-159, 1996.