

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

Bianchi, I.¹; Calderam, K.¹; Maschio, E.F.¹; Madeira, E.M.¹; Ulguim, R.R.¹; Corrêa, E.K.¹; Perondi, A.¹; Rambo, G.¹; De Leon, P.M.M.¹; Santos, E.C.S.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 CHAVES: Inseminação artificial, Congelamento, Amidas, Glicerol, Suínos.

INTRODUÇÃO

Na espécie suína os primeiros animais produzidos por inseminação artificial (IA) com sêmen congelado só foram obtidos em 1970 (6). No entanto, o uso de sêmen suíno congelado determina a queda de 20 a 30% nos resultados de taxa de parição e dois a três leitões a menos por leitegada (3). 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 com obtenção de bons resultados, especialmente em eqüinos com o uso de diferentes amidas (5). A superioridade do uso de dimetilacetamida em relação ao glicerol sobre parâmetros de avaliação *in vitro* de sêmen suíno congelado, foi demonstrada por Bianchi *et al.* (1). O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da dimetilacetamida (DMA) e glicerol na criopreservação de sêmen suíno, sobre as taxas de concepção e fertilização *in vivo*, utilizando inseminação artificial pós-cervical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado sêmen de um macho suíno cruzado (Landrace x Large White), com aproximadamente 24 meses de idade, que apresentava fertilidade conhecida. Imediatamente após a coleta do sêmen, a fração rica em espermatozoides (SPTZ) foi diluída (1:1, v/v), em tubo em BTS (4). O método de congelamento utilizado foi o descrito por Westendorf *et al.* (11) e Bordignon *et al.* (2), com modificações feitas por Bianchi *et al.* (1). A curva de resfriamento após a diluição inicial foi de 60 min a 24 °C e, após, 60 min a 15 °C. Ao atingir 15 °C, foi realizada a centrifugação (800 x g por 10 min), para a retirada do plasma seminal. O sedimento de espermatozoides (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 450×10^6 de SPTZ. Após realizou-se o resfriamento por 90 min até 5 °C, quando foi re-suspenso nos diluidores de congelamento (DC) a base dos crioprotetores Glicerol e N,N-Dimetilacetamida. 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, ou seja, para cada 2 ml de sêmen com DR foi adicionado 1 ml de DC. Nesta proporção obteve-se uma concentração final de 3% para o congelamento com glicerol (11) e a 5% para DMA (1). Em seguida a adição do DC o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, contendo a concentração de 150×10^6 SPTZ/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido, 5 cm acima do nível do nitrogênio, 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. Para avaliação da capacidade fertilizante *in vivo* do sêmen congelado em glicerol e dimetilacetamida, 60 leitoas pré-púberes (30 para cada grupo) com peso médio de 86,5 kg e idade de 155 d foram tratadas com 1000 UI de eCG (sendo considerado hora 0) e 70-72 h após com de 500 UI de hCG. 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 (2). Para elaboração das doses inseminantes, foi feito o descongelamento das palhetas do tratamento correspondente (Glicerol ou DMA) em banho-maria a 37 °C por 20 s imediatamente antes de cada IA. Após o descongelamento, o conteúdo das palhetas foi posto em uma dose de 60 ml de BTS em temperatura de 37 °C (2), a fim de atingir uma concentração de 1×10^9 SPTZ vivos (baseados na análise prévia da motilidade espermática). O método de IA utilizado foi o pós-cervical, que permite a deposição do sêmen no corpo do útero (8). No frigorífico as genitálias das fêmeas foram coletadas e transportadas para o laboratório, onde se determinou a taxa de ovulação para cada fêmea, a partir da contagem do número de corpos hemorrágicos em cada ovário. Para a colheita das estruturas (ócitos e embriões), cada oviduto (direito e esquerdo) foi lavado com 20 ml de PBS (solução de tampão fosfato) no sentido útero-ovário, sendo que o conteúdo lavado dentro de uma placa de petri e realizada a procura em lupa. Para cada fêmea foram determinadas as taxas de recuperação (TR) e fertilização (TF). A análise de concepção entre os grupos glicerol e DMA foi avaliada pelo qui-quadrado. As variáveis dependentes consideradas na análise de variância foram: número de corpos hemorrágicos; ócitos; 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 através do Statistix® (9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de avaliação *in vitro* do sêmen após a coleta e após o descongelamento estão apresentados na Tabela 1. O número de corpos hemorrágicos, taxa de recuperação e os resultados de concepção e fertilização para cada grupo, estão apresentados na Tabela 2. Usando sêmen congelado,

Bordignon *et al.* (2) conseguiram 85% de taxa de concepção trabalhando com leitoas pré-púberes sincronizadas, no entanto utilizando IA intracervical com doses de 6×10^9 SPTZ. Roca *et al.* (7) obtiveram em torno de 79% de taxa de prenhez aos 28 d, com o emprego de sêmen congelado através do método de IA intra-uterina profunda com dose de 1×10^9 SPTZ e na IA intracervical com doses com 6×10^9 SPTZ, porém utilizando fêmeas múltiparas. Taxa de prenhez de 40% aos 28 é citada com o uso de IA intra-uterina profunda utilizando dose de 1×10^9 de SPTZ (10). Não houve diferença entre os grupos glicerol e DMA na taxa de concepção ($P > 0,05$). A taxa de fertilização do grupo glicerol é comparável à obtida por Bordignon *et al.* (2), porém a fertilização do grupo DMA é superior aos resultados desses autores. Há que se considerar que os resultados neste estudo são oriundos de IA pós-cervical com doses de 1×10^9 de SPTZ, ao contrário das doses de $5-6 \times 10^9$ de SPTZ, embora utilizando IA intracervical. Não foi encontrada diferença ($P > 0,05$) na taxa de fertilização entre os grupos glicerol e DMA. No entanto o grupo DMA é superior 10% em relação ao glicerol, além do que possui uma tendência de maior taxa de concepção. Além disso, há que se destacar 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, ou seja 30% a mais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na fertilização *in vivo* com sêmen suíno congelado com DMA permitem considerá-la como um substituto ao glicerol nos protocolos de congelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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, 2006, CD-ROM.
2. 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.
3. JOHNSON, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa 1970 to 1985. In: INTERNATIONAL CONFERENCE BOAR SEMEN PRESERVATION, 1, 1985, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1985, p.199-222.
4. 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.
5. MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.
6. POLGE, C.; SALOMON, S.; WILMUT, I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. **Veterinary Record**, 87, 424-429, 1970.
7. ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, 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.
8. SERRET, C.G.; ALVARENGA, M.V.F.; CÓRIA, A.L.P.; DIAS, C.P.; CORCINI, C.D.; CORRÊA, M.N.; DESCHAMPS, J.C.; BIANCHI, I.; LUCIA, T.Jr. Intrauterine artificial insemination in female swine with distinct sperm concentrations, parities and methods of ovulation estimation. **Animal Reproduction**, v.2, p.250-256, 2005.
9. STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual**. Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.
10. WONGTAWAN, T.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses **Theriogenology**, v.65, p.773-787, 2006.
11. 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. 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

*CHIPO: Choque hipoosmótico

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 ($P > 0,05$).