

MÉTODOS DE CONGELAMENTO PARA SÊMEN SUÍNO E SEUS EFEITOS NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

MARTINS, Naiana Oliveira¹; BIANCHI, Ivan¹; CORRÊA, Márcio Nunes¹; PIASSI, Lígia¹; MIRAPALHETA, Elisângela¹; PERONDI, Arlan¹; CORCINI, Carine Dahl¹; COREZZOLLA, José Luiz¹

¹ PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos, Cenbiot-UFpel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 nmartins_fv@ufpel.edu.br (53) 91410003

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos protocolos de congelamento de sêmen suíno utilizados atualmente é baseada, ou no método descrito por Westendorf *et al.* (1975) (WE), no qual o plasma seminal é retirado somente quando a curva de resfriamento atingir 15°C, ou no método descrito por Paquignon *et al.* (1974) (PA), no qual, imediatamente após a coleta do ejaculado, é feita a remoção do plasma seminal através da centrifugação. Nos protocolos de congelamento, um crioprotetor externo usualmente adicionado aos diluentes é a gema de ovo, com o intuito de proteger a membrana da célula espermática das injúrias provocadas pelo processo de congelamento, especialmente num ponto crítico abaixo de 15°C. O efeito crioprotetor da gema de ovo é dado pela fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) [4, 16]. Os resultados insatisfatórios obtidos com sêmen suíno congelado, em geral, são atribuídos à ineficiência dos diluentes e crioprotetores, o que sugere que novas soluções crioprotetoras e métodos diferentes de congelamento devam ser testados [5, 8]. Outro fator limitante para a expansão do uso de sêmen suíno congelado é a grande variação observada na capacidade de congelabilidade do sêmen, entre diferentes reprodutores, considerando-se também a instabilidade da célula espermática do suíno quando comparada a outras espécies no processo de congelamento, provavelmente devido a características de composição da sua membrana celular. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes métodos de congelamento na motilidade espermática de sêmen suíno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois machos (A e B) suínos cruzados (Landrace x Large White), com coleta de dez ejaculados de cada macho. As coletas feitas através do método da mão-enluvada [2], 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 foram avaliados a motilidade (0 a 100%) e vigor (escala de 0 a 5) espermáticos, por microscopia ótica em aumento de 200 x [3]. Somente ejaculados com motilidade > 70% foram utilizados. Para o método descrito por Westendorf *et al.* (1975) imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota de 10 ml da fração rica em espermatozóides foi diluída (1:1, v/v), em tubo cônico de 50 ml, em BTS [11]. O sêmen foi submetido a uma curva de resfriamento após a diluição inicial de 90 min a 20°C e logo após a outra curva de 180 min à 15°C. Após atingir 15°C, o tratamento foi submetido à centrifugação (800 x g por 10 min), 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 $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml. Após, 2 ml da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 ml, realizando-se o resfriamento por 90 minutos à 5°C. Após o término do tempo à 5°C, os tubos cônicos com 2 ml de espermatozoides diluídos foram re-suspensos em 1 ml do diluidor de congelamento (89,5% de diluidor de resfriamento WE + 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e 9% glicerol, v/v; pH de 6,83) para uma concentração final de $1,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml e 3% de glicerol. Após a adição do diluidor de congelamento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml (Minitüb, Germany), com concentração de 500×10^6 espermatozoides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C. Seguindo o método Paquignon *et al.* (1974), após a coleta e avaliação inicial do ejaculado, tubos cônicos de 15 ml receberam alíquotas da fração rica em células do ejaculado de cada macho, até a concentração de 6×10^9 espermatozoides/tubo. Estas alíquotas foram imediatamente centrifugadas a $800 \times g$ por 15 minutos, a fim de retirar o plasma seminal. Após a centrifugação, o *pellet* foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (5,67%, v/v, de glicose; 22,5%, v/v, de gema de ovo; pH 6,20), para atingir 4 ml e concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml. Foi realizada a curva de resfriamento por 120 minutos a 20°C e após 180 minutos a 15°C. Após atingir 15°C, os tubos cônicos com 4 ml de espermatozoides diluídos receberam 2 ml do diluidor de congelamento PA (91,0% de diluidor de resfriamento PA + 9,0% glicerol, v/v; pH de 6,14), para atingirem concentração final de $1,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml e 3% de glicerol. Feita a adição do diluidor de congelamento, os tratamentos permaneceram 60 minutos a 5°C. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, com concentração de 500×10^6 espermatozoides/palheta, as quais foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 4 minutos, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C. O descongelamento foi realizado a 37°C por 20 s, em banho-maria com circulação de água. Após o descongelamento, o sêmen foi incubado em tubos cônicos de 15 ml a 37°C para a avaliação da motilidade para ambos os métodos WE e PA, através de microscopia ótica a 200 x [3]. No descongelamento, as palhetas do método WE e PA foram re-suspensas (1:10, v/v) em tubos cônicos de 15 ml [10], em BTS, incubados a 37°C. A avaliação da motilidade espermática foi realizada através de microscopia ótica (200 x), 10 e 30 minutos após o descongelamento. A motilidade foi comparada por análise de variância, com posterior comparação entre médias pelo método LSD. Todas as análises foram realizadas com o software Statistix® (2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade para o método WE (68%) foi superior a do método PA (52%), no pré-congelamento ($P < 0,05$) (Tabela 1).

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

Metodologia congelamento	Momento da Avaliação		
	Pré-congelamento	Pós-descongelamento	
		10 m	30 m
Método de Westendorf <i>et al.</i> (1975)	68,0 ^a	36,0 ^x	35,5 ^c
Método de Paquignon <i>et al.</i> (1974)	52,0 ^b	24,0 ^y	22,0 ^d

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

Esta diferença se confirmou aos 10 minutos (36,0% e 24,0%, respectivamente; $P < 0,05$) e aos 30 min pós-descongelamento (35,5% e 22,0%, respectivamente; $P < 0,05$) (Tabela 1). O fato de que o método WE tenha apresentado motilidade superior ao método PA pode ser atribuído a alguns fatores. Um deles seria a presença de plasma seminal durante a curva de resfriamento, o que pode ter influenciado positivamente a motilidade. No entanto, este efeito é controverso, pois existem relatos de que a presença de plasma seminal é associada com maior sensibilidade do espermatozóide suíno ao choque térmico [12], ou que a remoção deste não interferiu na viabilidade pós-descongelamento [13]. Ainda, existem relatos de que o plasma seminal adicionado à fração rica do ejaculado, não teria influência sobre a qualidade do sêmen [7]. Por outro lado, é importante ressaltar que, no método PA, o diluidor de congelamento contendo glicerol foi adicionado ao sêmen a 15°C, permanecendo durante 60 minutos antes do sêmen ser congelado a 5°C. Já no método WE, o diluidor de congelamento que contém o glicerol foi adicionado ao sêmen a 5°C e, imediatamente após, as amostras foram congeladas. Portanto, a exposição prolongada ao glicerol pode ter prejudicado a motilidade do sêmen, em função do potencial efeito citotóxico do glicerol [1, 6].

4. CONCLUSÕES

O método de congelamento desenvolvido por Westendorf *et al.* (1975) apresentou melhores resultados de motilidade espermática para o sêmen, após o descongelamento, quando comparado ao método desenvolvido por Paquignon *et al.* (1974) que foi associado com redução na motilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALMLID, T.; JOHNSON, L.A. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Animal Science**. 66, 2899-2905. 1988.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**. 62, 3-22. 2000.
- [7] JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**. 62, 143-172. 2000.
- [8] 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.
- [9] PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M.; du MESNIL du BUISSON, F.

Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. **Journ. Rech. Porc. en France**, p. 71-76, 1974.

[10] 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.

[11] 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.

[12] PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**. 34 (2), 278-283, 1972.

[13] SALAMON, S. Deep freezing of boar semen III. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Austrian Journal Biology Science**. 26, 239-247, 1973.

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

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

[16] WATSON PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **J Reprod Fertil.**; 62, 483-492. 1981.

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

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