



Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
Universidade Federal de Pelotas



Tolerância ao congelamento e composição de
ácidos graxos da membrana espermática de
suínos de diferentes raças

Francielle Bado
Thiago Luis Rockenbach
Orientadora: Viviane Rabassa

Pelotas, 15 de Dezembro de 2009



REPRODUCTION

RESEARCH

Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm

K E Waterhouse^{1,2}, P O Hofmo³, A Tverdal⁴ and R R Miller Jr⁵

Fator de impacto: 3.073

INTRODUÇÃO



IMPORTÂNCIA DA IA EM SUÍNOS



Uso de sêmen de machos superiores
Aproveitamento do material genético
Controle de doenças



Custo de material
Número de reprodutores

INTRODUÇÃO



SÊMEN RESFRIADO

Temperatura

5°C



15 - 18°C



INTRODUÇÃO



SÊMEN CONGELADO

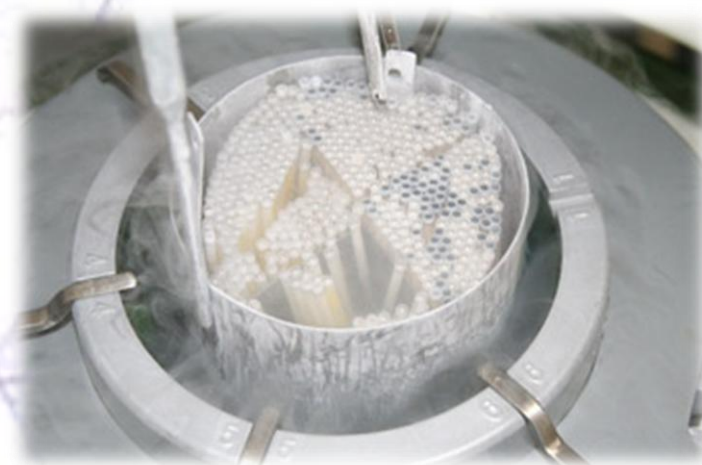
VANTAGENS:

- Tempo de armazenamento ilimitado
- Longas distâncias

DESVANTAGENS:

- ↓ Fertilidade e tamanho da leitegada, taxa de parição.
- Requer duas a três vezes mais espermatozóides

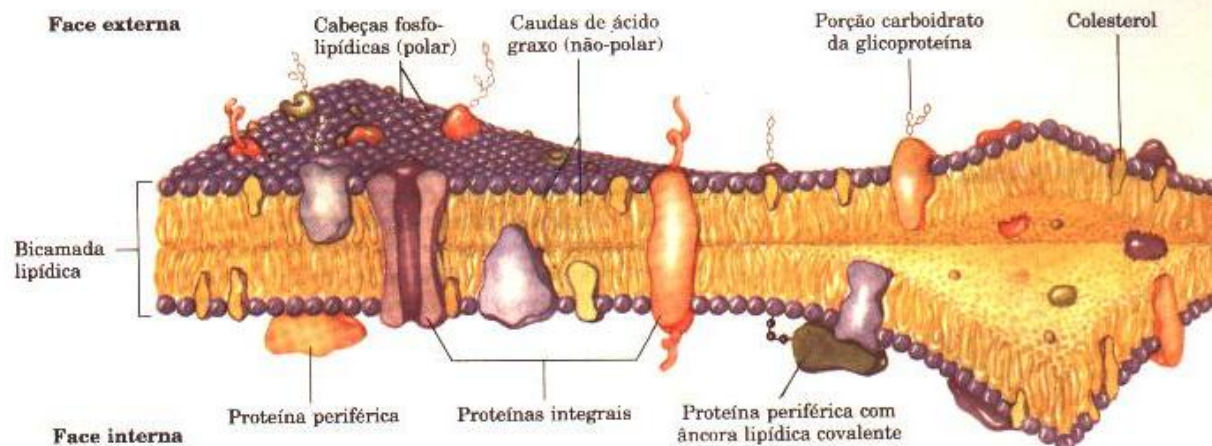
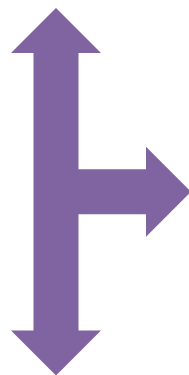
-196°C



INTRODUÇÃO

PROBLEMAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNOS

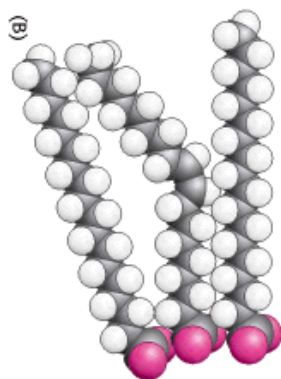
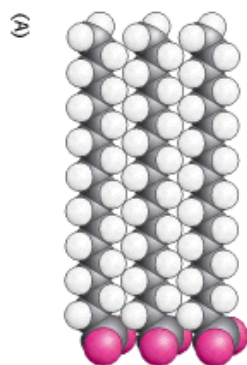
↓ 50%



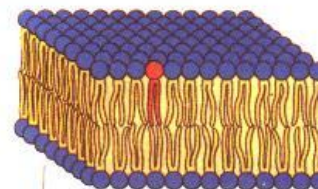
- Composição da MP (↓ colesterol, AG poliinsaturados)
- Choque térmico (desestruturação de lipídios)
- Cristais de gelo
- Estresse osmótico

INTRODUÇÃO

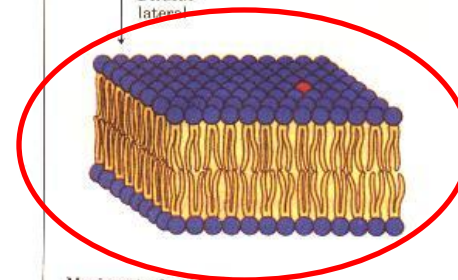
FLUIDEZ DE MEMBRANA



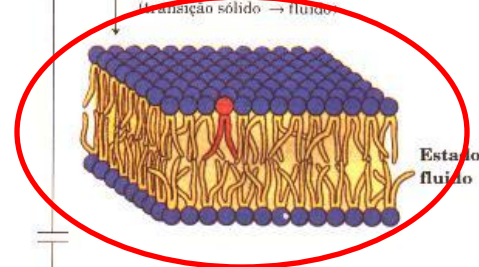
Estado paracristalino (sólido)



Difusão lateral

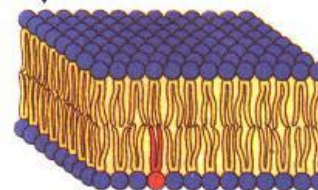


Movimentação térmica das cadeias acil laterais (transição sólido → líquido)



Estado fluido

Difusão através da bicamada ("basculante")



OBJETIVO

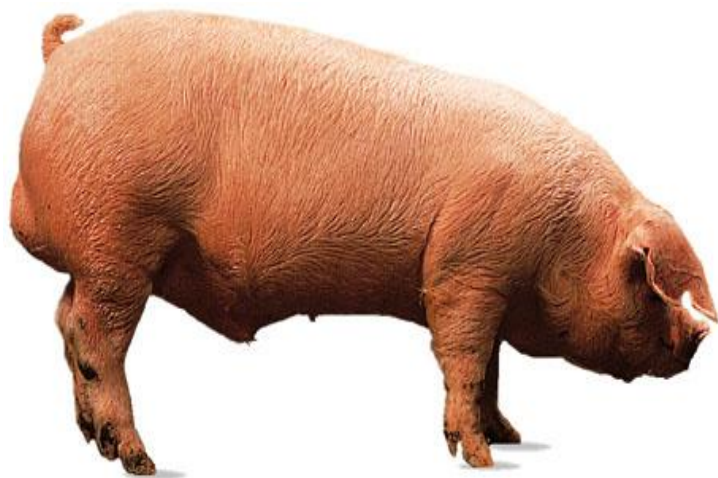


Investigar a composição de AG na membrana plasmática de espermatozóides e os efeitos da refrigeração, congelamento e descongelamento sobre a MP e integridade do acrossoma do esperma de cachaaos Landrace e Duroc

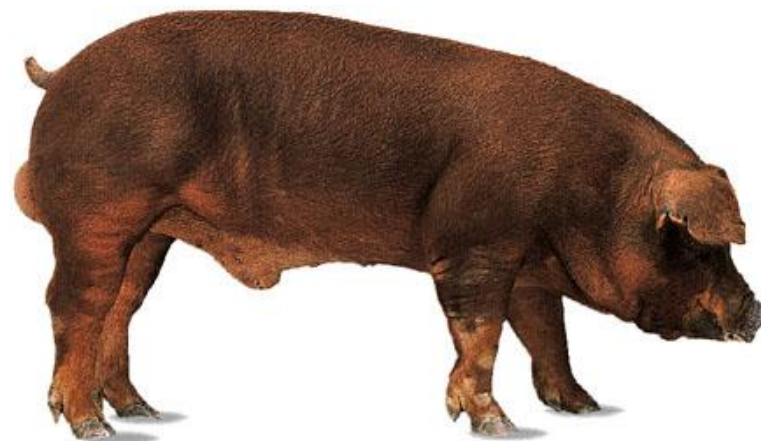
MATERIAIS E MÉTODOS



12 cachaaos Landrace



12 cachaaos Duroc



MATERIAIS E MÉTODOS

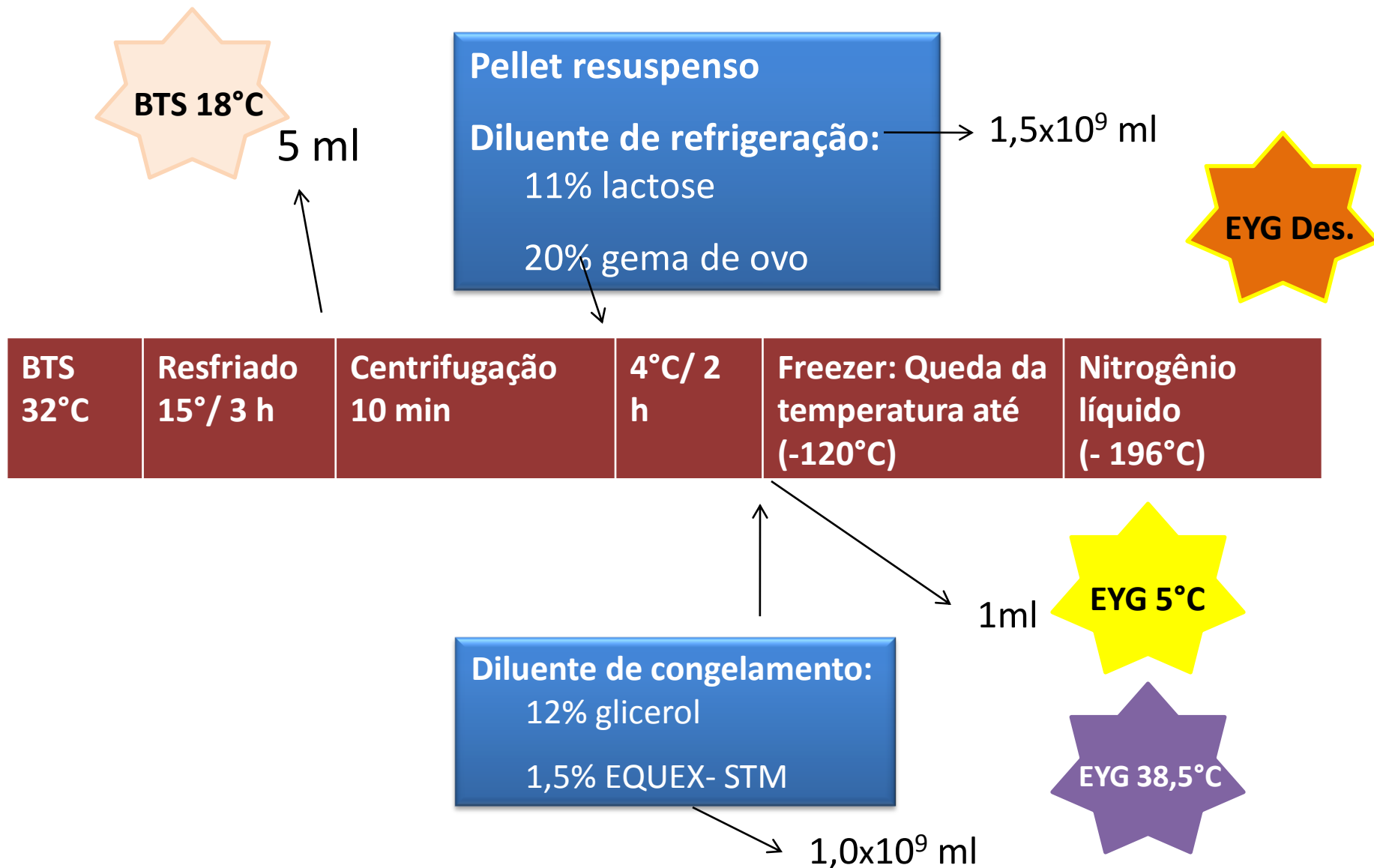


- 1 coleta de sêmen
- Método mão enluvada



- Filtrado em gaze
- Volume, concentração espermática
- Diluído em BTS (Bel Tisville Thawing Solution)
- Morfologia e motilidade (80%)

MATERIAIS E MÉTODOS



MATERIAIS E MÉTODOS



MEMBRANA PLASMÁTICA - INTEGRIDADE ACROSSÔMICA

1- BTS 18°C

2- EYG 5°C

3- EYG reaquecido 38,5°

4- EYG descongelado

PBS (2×10^6 esp./ml)



Iodeto de Propídio (PI)



MEMBRANA PLASMÁTICA

PNA R-PE



INTEGRIDADE ACROSSÔMICA

SYBR-14



Exclui partículas de gema de ovo

MATERIAIS E MÉTODOS



CITOMETRIA DE FLUXO

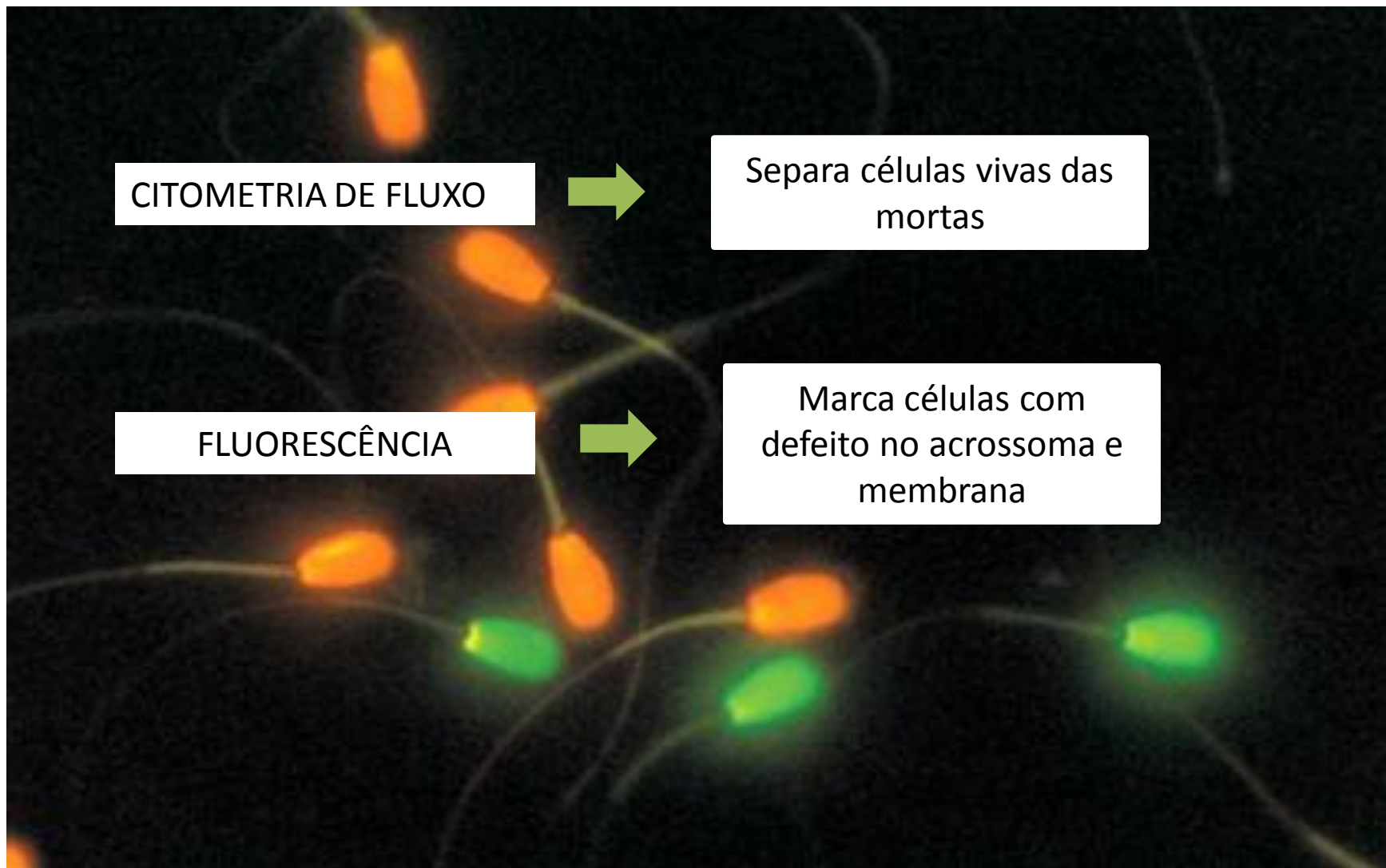


Separa células vivas das mortas

FLUORESCÊNCIA



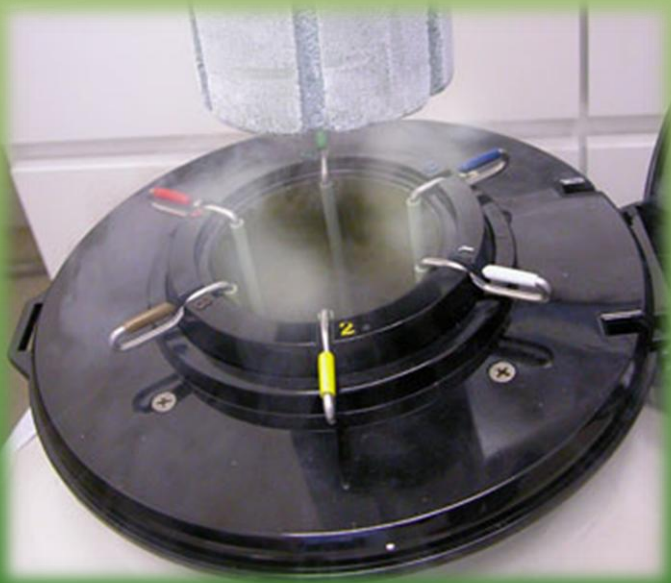
Marca células com defeito no acrossoma e membrana



MATERIAIS E MÉTODOS

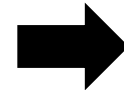
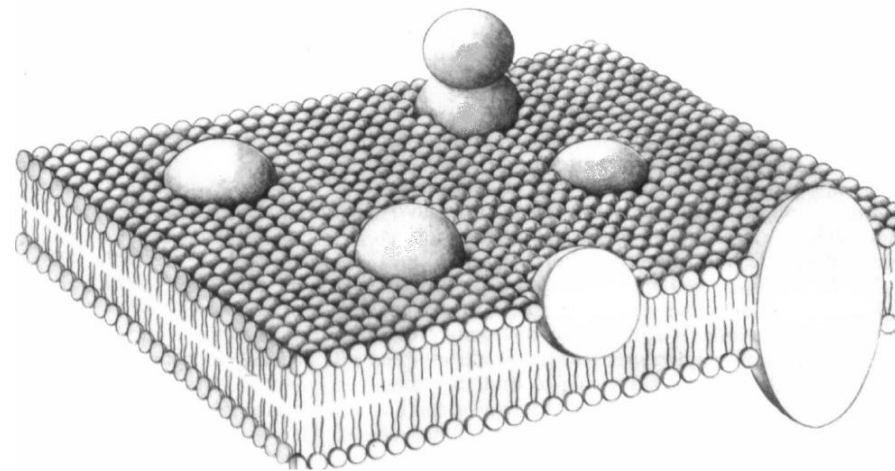


ISOLAMENTO DA MEMBRANA PLASMÁTICA



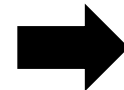
Técnica modificada de
AGRAWAL et al. (1988)

ISOLAMENTO DE LIPÍDIOS DA MEMBRANA PLASMÁTICA



Técnica FOLCH et al.(1957)

CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MEMBRANA PLASMÁTICA

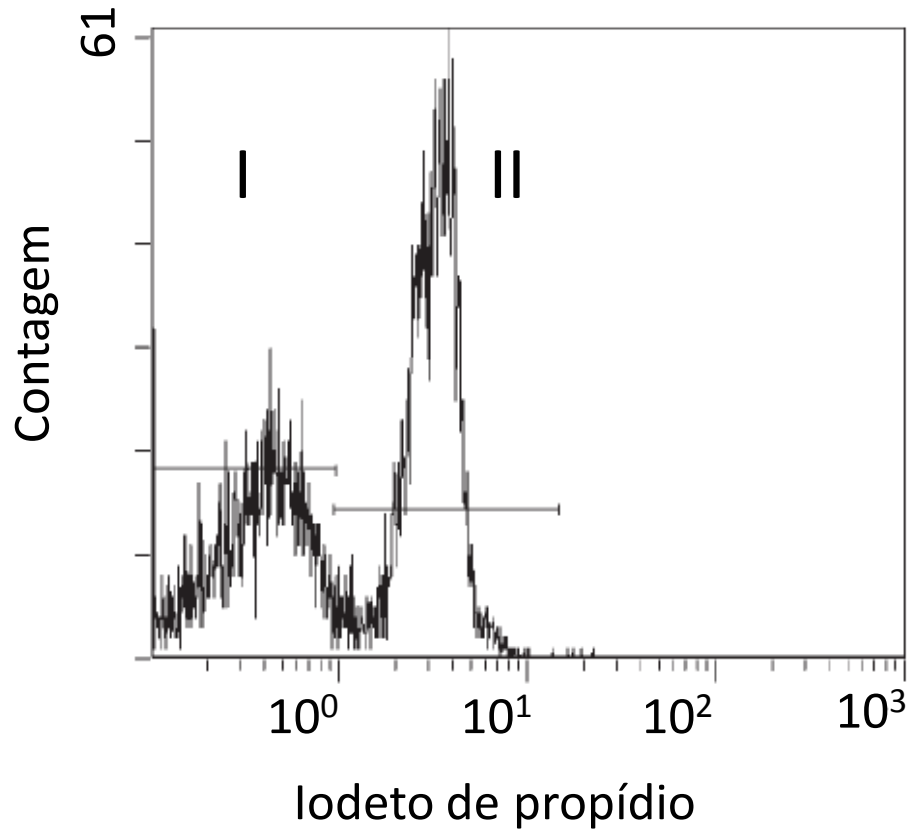


Cromatografia gasosa

RESULTADOS E DISCUSSÃO



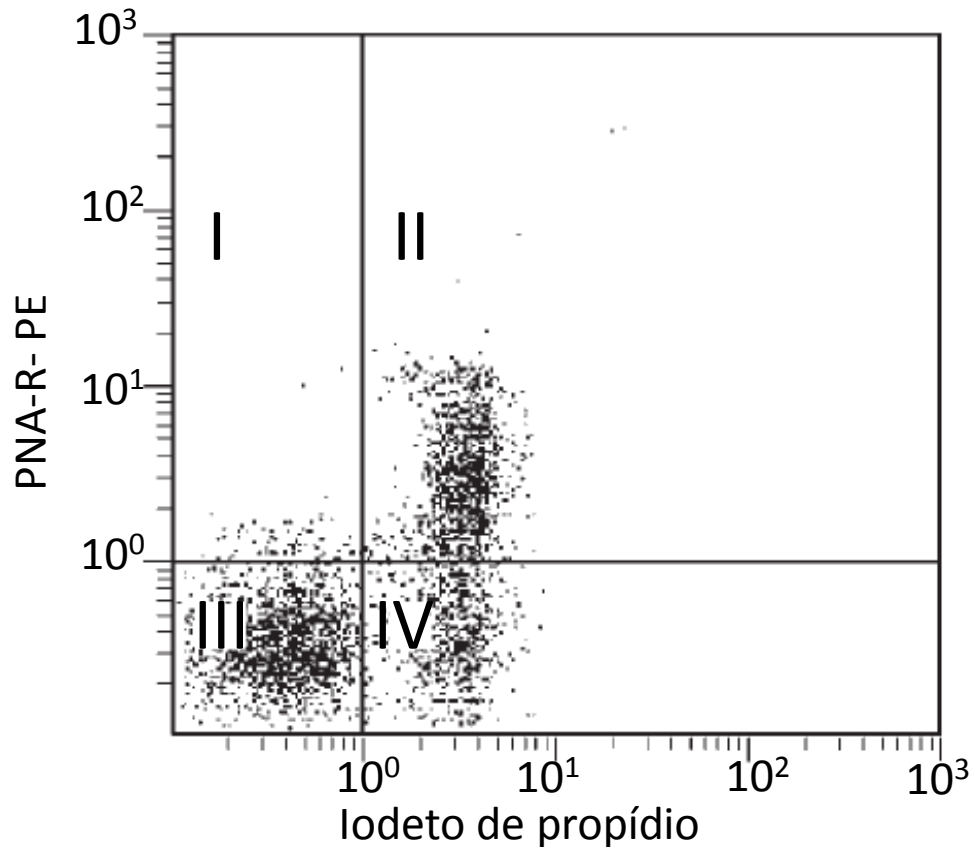
FIGURA 1: Histograma representativo de intensidade de fluorescência de PI no congelamento e descongelamento, mostrando a percentagem de espermatozóides vivos e mortos



RESULTADOS E DISCUSSÃO



FIGURA 2: Citograma representando fluorescência de esperma congelado-descongelado de cachazo PNA-R-PE x PI



- I- Espermatozóides vivos com acrosssoma danificado
- II- Espermatozóides mortos com acrosssoma danificado
- III- Espermatozóides vivos com acrosssoma intacto
- IV- Espermatozóides mortos com acrosssoma intacto

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Tabela 1: Porcentagem de espermatozóide vivo e acrossoma intacto em diferentes temperaturas de armazenamento

	18°C ^a	5°C ^b	38,5°C ^b	Descongelado ^b
(%) espermatozóides vivos				
Landrace	95.5 (1.5)	92.4 (1.1)	87.3 (2.9)	48.8 (10.1)
Duroc	94.3 (2.6)	92.8 (2.0)	87.6 (3.6)	51.3 (11.0)
(%) integridade do acrossoma				
Landrace	94.4 (1.7)	91.1 (1.5)	63.5 (18.9)	44.7 (10.5)
Duroc	92.5 (4.4)	91.9 (2.2)	71.7 (12.8)	45.0 (8.8)

^a esperma diluído e armazenado em BTS; ^b esperma diluído e armazenado em EYG

RESULTADOS E DISCUSSÃO



TABELA 2: %-g DE ÁCIDOS GRAXOS ENCONTRADOS NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES DE LANDRACE E DUROC

ÁCIDOS GRAXOS	LANDRACE	DUROC
Saturados, total	37.3 (7.15)	37.4 (6.0)
12:0	0.35 (0.52)	0.05 (0,17)
14:0	2.15 (3.30)	1.11 (0.51)
16:0	18.35 (4.03)	18.93 (3.10)
18:0	16.44 (4.12)	17.31 (3.46)
RELAÇÃO ÁCIDOS GRAXOS		
Insaturados/saturados	1.76 (0.46)	1.73 (0.38)
22/outros ácidos graxos	0.60 (0.23)	0.52 (0.18)
22:6, n-3/ 22:5, n-6	1.20 (0.43)	1.39 (0.61)

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Monoinsaturados, total	12.4 (3.7)	13.4 (3.0)
14:1	0.67 (1.18)	0.21 (0.59)
16:1	nd	0.48 (0.84)
18:1, n-9	11.75 (3.67)	12.71 (3.48)
Poliinsaturados, total	50.3 (7.1)	49.1 (5.9)
18:2, n-6	6.32 (2.16)	6.83 (2.43)
18:3, n-3	1.59 (4.55)	0.30 (0.89)
20:4, n-3	6.21 (4.53)	8.76 (10.36)
22:3, n-6	1.55 (2.17)	0.30 (0.70)
22:4, n-6	1.87 (2.63)	0.75 (1.16)
22:5, n-6	15.40 (6.01)	13.92 (5.41)
22:5, n-3	0.45 (0.86)	0.26 (0.43)
22:6, n-3	16.91 (6.25)	18.03 (5.95)
nd : não detectado		

RESULTADOS E DISCUSSÃO



TABELA 3: COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS PORCENTAGENS DE ESPERMATOZÓIDES VIVOS APÓS O CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO EM RELAÇÃO A ÁCIDOS GRAXOS DE ESPERMAS CONGELADOS-DESCONGELADOS DE CACHAÇOS LANDRACE E DUROC

RELAÇÃO	(%) ESPERMA VIVO LANDRACE	(%) ESPERMA VIVO DUROC
Insaturados/saturados	0.42	-0.04
22/outros ácidos graxos	0.64*	0.67*
22:6, n-3/22:5, n-6	-0.57	-0.24
*P<0.05.		

RESULTADOS E DISCUSSÃO



- Hipótese confirmada: ácidos graxos relacionados a sobrevivência espermática
- Não houve diferença significativa de espermatozóides vivos pós-descongelamento comparando as duas raças
- Perda de lipídio durante criopreservação
- Variação individual dos cachaços



CONCLUSÃO



A taxa de sobrevivência dos espermatozoides após o congelamento e descongelamento é uma característica do indivíduo macho e não da raça, que está parcialmente relacionado com as quantidades de AG poliinsaturados de cadeia longa na MP do espermatozoide.



**MUITO
OBRIGADO!!!**

