

## USO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NO CONGELAMENTO DE SÊMEN SUÍNO

Bianchi, I.<sup>1</sup>; Calderam, K.<sup>1</sup>; Maschio, E.F.<sup>1</sup>; Madeira, E.M.<sup>1</sup>; Ulguim, R.R.<sup>1</sup>; Corrêa, E.K.<sup>1</sup>; Lucia, T. Jr.<sup>1</sup>; Deschamps, J.C.<sup>1</sup>; Corrêa, M.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PIGPEL – Pesquisa, Ensino e Serviços em Produção de Suínos  
Departamento de Clínicas Veterinária, Hospital de Clínicas Veterinária, Campus Universitário s/n°,  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS/Brasil, CEP: 96010-900

**PALAVRAS-CHAVE:** Amidas, Glicerol, Crioprotetores, Criopreservação, Sêmen, Suínos

## INTRODUÇÃO

O glicerol é o crioprotetor intracelular mais utilizado nos protocolos de congelamento para sêmen suíno, normalmente na concentração de 3% (10,20). No entanto, o glicerol (Gli) em determinadas concentrações tem um potencial efeito citotóxico na célula espermática em detrimento das suas características benéficas como crioprotetor (7,19), além de um efeito contraceptivo relatado em diferentes espécies (6,15). A ineficiência do congelamento do sêmen suíno é atribuída aos crioprotetores e diluentes utilizados, sugerindo que outras soluções crioprotetoras sejam testadas (12). Apesar disto são limitadas às publicações nesse sentido. Em eqüinos a criopreservação de sêmen enfrenta problemas semelhantes aos relatados em suínos. Porém, estudos com a utilização de amidas como crioprotetores em substituição ou associação com o glicerol têm sido conduzidos com obtenção de bons resultados (1). O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso das amidas: metilformamida (MF), dimetilformamida (DMF) e dimetilacetamida (DMA) como crioprotetores intracelulares no congelamento de sêmen suíno.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados quatro machos suínos cruzados (Landrace x Large White) com aproximadamente 24 meses de idade, os quais apresentavam fertilidade conhecida e eram mantidos em baias individuais, sob as mesmas condições ambientais, na Estação Experimental da Palma, Universidade Federal de Pelotas (Brasil).

**Coleta e processamento do sêmen:** Somente a porção do ejaculado com maior concentração espermática foi utilizada para o processo de congelamento e com motilidade > 70%. Dez ejaculados foram coletados de cada macho. Imediatamente após a coleta do sêmen foi obtida uma alíquota de 20 mL, em tubo cônico de 50 mL, e diluída (1:1, v/v) no diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (16). Após a diluição inicial foi feito o resfriamento por 90 min a 24 °C e seguiu-se novo resfriamento por mais 90 min até 15 °C. Aos 15 °C, foi feita a centrifugação em centrífuga refrigerada a 800 x g por 10 min (SORVALL<sup>®</sup>RC6). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozóides foi re-suspensão no diluidor de resfriamento (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo) para uma concentração de  $1,5 \times 10^9$  espermatozóides/mL. Após foi feito o resfriamento por 90 min até 5 °C. No processo de congelamento foram utilizados quatro crioprotetores intracelulares: Glicerol <sup>1</sup> (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), N-Metilformamida <sup>2</sup> (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO), N,N-Dimetilformamida <sup>3</sup> (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO) e N,N-Dimetilacetamida <sup>4</sup> (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO). O glicerol foi utilizado na concentração final de 3% (20) e as amidas na concentração de 5%. Os diluidores de congelamento (Gli3%; MF5%; DMF5% e DMA5%) a serem adicionados a 5 °C foram elaborados a partir do diluidor de resfriamento, acrescido de 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste<sup>5</sup> e os respectivos crioprotetores para concentração final acima mencionada, v/v). O envase do sêmen foi feito em palhetas de 0,5 mL, com concentração final de  $500 \times 10^6$  espermatozóides/palhetas. 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 até o descongelamento. As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 20 s, sendo re-suspensas em tubo cônico contendo 10 mL de BTS previamente aquecido a 37 °C (1:20, v/v) (14).

**Avaliações:** Foi feita a incubação em banho-maria a 37 °C por 10 min e avaliada a motilidade espermática (0 a 100 %) através de microscopia ótica com contraste de fases a 200 x. Após a avaliação da motilidade foi feita à avaliação da integridade de membrana espermática por fluorescência (5), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína<sup>6</sup> (CFDA) e Iodeto de Propídio<sup>7</sup> (IP). A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozóides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (espermatozóides corados em verde em toda sua extensão) e lesados (espermatozóides corados em vermelho).

**Análise estatística:** Para as variáveis dependentes: percentual de motilidade e espermatozóides com membrana íntegra no descongelamento foi gerada análise de variância pelo modelo linear através de medidas repetidas, a fim de isolar o efeito de cada coleta e de cada macho sobre os parâmetros avaliados. A

<sup>1</sup> G 4094 - Merck

<sup>2</sup> M 2769 - Sigma

<sup>3</sup> D 4254 - Sigma

<sup>4</sup> D 5511 - Sigma

<sup>5</sup> Minitüb, Germany

<sup>6</sup> C 5041 - Sigma

<sup>7</sup> P 4170 - Sigma

comparação de médias foi feita no teste de Tukey e utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, para testar a correlação entre as técnicas de motilidade e integridade de membrana. Todas as análises foram através do mesmo programa estatístico (17).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade entre os tratamentos DMA5% (53,8%) e DMF5% (50,6%) não teve diferença ( $P > 0,05$ ), mas foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos tratamentos MF5% (43,2%) e Gli3% (38,1%), sendo que estes não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). Em relação ao percentual de espermatozoides que apresentavam membrana íntegra após o descongelamento, o tratamento DMA5% (50,9) foi superior ( $P < 0,05$ ) aos tratamentos MF5% (43,3) e Gli3% (34,4), porém não diferiu do DMF5% (47,9). A correlação observada entre as técnicas de integridade de membrana por fluorescência (CFDA e IP) e microscopia óptica foi altamente positiva e significativa ( $r = 0,92$ ,  $P < 0,0001$ ). Trabalhos com uso de amidas em substituição ou associação com glicerol têm sido realizados com sucesso em várias espécies: eqüinos (11), galos (18), peixes (13), gansos (9) e coelhos (4). Os resultados deste trabalho utilizando os tratamentos dimetilacetamida e dimetilformamida a 5% foram superiores, tanto na motilidade como na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides após o congelamento, em relação ao tratamento normalmente utilizado para congelamento de sêmen suíno (glicerol a 3%). As correlações encontradas entre as avaliações de motilidade e integridade de membrana estão de acordo com dados de outros autores (3). O tratamento com metilformamida a 5% ainda que tenha sido inferior na motilidade após o descongelamento em relação aos tratamentos DMA5% e DMF5%, e inferior ao DMA5% na integridade de membrana, mesmo assim ele se equivale ao tratamento com glicerol quanto a motilidade pós-descongelamento e é superior ao glicerol na integridade de membrana, demonstrando a eficácia das amidas como potenciais crioprotetores a serem utilizados no congelamento de sêmen suíno. A superioridade dos crioprotetores a base de amidas em relação ao glicerol pode estar supostamente relacionado seu mecanismo de ação. Os radicais hidroxila do glicerol podem ligar-se entre si, diminuindo a probabilidade de ligações com as moléculas de água, que é uma característica desfavorável ao processo de criopreservação, conferindo assim uma alta viscosidade (8). As amidas possuem um mecanismo de ação crioprotetor diferente do glicerol, devido sua estrutura molecular e sua habilidade de permear a membrana celular. Desta forma supõem-se que as amidas possuam uma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula da água, desempenhando um mecanismo crioprotetor celular mais eficiente que o glicerol (2,8).

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a eficiência da utilização das amidas, especialmente dimetilacetamida e dimetilformamida, como alternativa de crioprotetores intracelulares em substituição ao glicerol no congelamento de sêmen suíno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVARENGA, M.A. *et al.* Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa, in: **Proceedings...** 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Stockholm, p.157, 2000.
2. BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential, **J. Androl.** v.22, p.1061-1069, 2001.
3. FRASER, L. *et al.* Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality, **Reprod. Dom. Anim.** v.36, p.325-329, 2001.
4. HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa, **J. Reprod. Fertil.** v.60, p.247-252, 1980.
5. HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, **J. Reprod. Fertil.** v.88, p.343-352, 1990.
6. HAY, M.A. *et al.* Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs, **J. Reprod. Fertil.** v.51, p.99-108, 1997.
7. HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen, **Anim. Reprod. Sci.** v.62, p.3-22, 2000.
8. KAROW, A.M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists.** Augusta, Georgia, USA, 2001.
9. LUKASZEWICZ, E. An effective method for freezing White Italian Garder semen, **Theriogenology.** v.58, p.19-27, 2002.
10. MALDJIAN, A. *et al.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, **Theriogenology.** v.63, p.411-421, 2005.
11. MEDEIROS, A.S.L. *et al.* Cryopreservation of stallion sperm using different amides, **Theriogenology.** v.58, p.273-276, 2002.
12. MEDEIROS, C.M.O. *et al.* Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, **Theriogenology.** v.57, p.327-344, 2002.
13. OGIER DE BAULNY, B. *et al.* Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants, **Cryobiology.** v.39, p.177-184, 1999.
14. PEÑA, F.J. *et al.* Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity, **Theriogenology.** v.60, p.677-689, 2003.
15. PHILLIPS, J.J. *et al.* Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose, **Poultry Sci.** v.75, p.915-923, 1996.
16. PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, **J. Anim. Sci.** v.40, p.99-102, 1975.
17. STATISTIX®. **Statistix for Windows User's Manual.** Ed. Analytical Software. Tallahassee, Fl. 2004.
18. TSELUTIN, K. *et al.* Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa, **Poultry Sci.** v.78, p.586-590, 1999.
19. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, **Anim. Reprod. Sci.** v.60, p.481-492, 2000.
20. WESTENDORF, P. *et al.* Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren, **Dtsch. Tierarztl. Wschr.** v.82, p.261-267, 1975.