

EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELAMENTO SOBRE A MOTILIDADE DE SÊMEN SUÍNO

Bianchi I.¹; Corrêa, M.N.¹; *Piassi, L.M.¹; Lucia Jr., T.¹, Corrêa, E.K.¹; Madeira, E.M.¹; Perondi, A.¹; Corcine, C.D.¹; Corezzolla, J.L.¹; Deschamps, J.C.¹

¹PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos, Centro de Biotecnologia, Campus Universitário s/nº, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 ibianchi@ufpel.edu.br (53) 84051356

INTRODUÇÃO

A maioria dos protocolos de congelamento utilizados atualmente é baseada 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 por centrifugação. Nos protocolos de congelamento, a gema de ovo é usualmente adicionada aos diluidores, a fim de proteger a membrana da célula espermática das injúrias provocadas por baixas temperaturas, especialmente 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 (15, 18). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes métodos de congelamento para sêmen suíno.

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 colheitas foram realizadas 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 200x (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 espermatozoides foi diluída (1:1, v/v), em tubo cônico de 50 mL, em BTS (11). A curva de resfriamento após a diluição inicial foi de 90 m a 20°C e, após, 180 m a 15°C. Após atingir 15°C, o tratamento foi submetido à centrifugação (800 x g por 10 m), para retirada do plasma seminal. O *pellet* de espermatozoides obtido da centrifugação foi re-suspensão 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 x 10⁹ espermatozoides/mL. Após, 2 mL da solução foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL, realizando-se o resfriamento por 90 m à 5°C. Aos 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 x 10⁹ 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 x 10⁶ espermatozoides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 m, 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 x 10⁹ espermatozoides/tubo. Estas alíquotas foram imediatamente centrifugadas a 800 x g por 15 m, a fim de retirar o plasma seminal. Após a centrifugação, o *pellet* foi re-suspensão 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 x 10⁹ células/mL. Foi realizada a curva de resfriamento por 120 m a 20°C e após 180 m 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 x 10⁹ espermatozoides/mL e 3% de glicerol. Feita a adição do diluidor de congelamento, os tratamentos permaneceram 60 m a 5°C. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 500 x 10⁶ células/palheta, as quais foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 4 m, 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 a adição 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 m após o descongelamento. A motilidade foi comparada por análise de variância, com posterior comparação entre médias pelo método LSD. Todas análises foram realizadas com o software Statistix® (2004).

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). Esta diferença se confirmou aos 10 m (36,0% e 24,0%, respectivamente; P < 0,05) e aos 30 m 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 espermatozoide 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 m 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).

CONCLUSÕES

O método de congelamento WE proporcionou melhores resultados na motilidade do sêmen suíno descongelado em comparação com o método PA.

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; CRÉTE 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 assessment 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 pailletten-verfahren. *Dtsch Tierarztl Wschr.* 82, 261-267, 1975.
18. WOELDEERS, H.; MATTHIJS, A.; DEN BESTEN, N. Boar variation in "freezability" of the semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 31 (1), 153-159, 1996.

Tabela 1: Motilidades espermática pré e pós-descongelamento de acordo com a metodologia de congelamento utilizada

Metodologia congelamento	Momento da Avaliação		
	Pré-congelamento	Pós-descongelamento	
		10 m	30 m
WE	68,0 ^a	36,0 ^x	35,5 ^c
PA	52,0 ^b	24,0 ^y	22,0 ^d

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